



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**PROBLEMATIKA PRODUKCE ŘAS RODU CHLORELLA V  
PRŮTOČNÝCH BIOREAKTORECH**

ISSUES OF THE ALGAE CHLORELLA PRODUCTION IN FLOW BIOREACTORS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Kristína Jankovičová

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

doc. Ing. Tomáš Svěrák, CSc.

**BRNO 2017**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1101/2016  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Kristína Jankovičová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Biotechnologie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Tomáš Svěrák, CSc.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název bakalářské práce:

Problematika produkce řas rodu *Chlorella* v průtočných bioreaktorech

### Zadání bakalářské práce:

Literární rešerše kultivačních podmínek a užitných vlastností řas rodu *Chlorella*,  
laboratorní kultivace vybraného typu řas,  
vyhodnocení testů a porovnání s literárními údaji

### Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Kristína Jankovičová  
student(ka)

-----  
doc. Ing. Tomáš Svěrák, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Bakalárska práca je zameraná na kultiváciu rias rodu chlorella. Teoretická časť práce pojednáva o charakteristike mikroriasy, jej využití a rôznych spôsoboch kultivácie. Zameriava sa na najdôležitejšie faktory ovplyvňujúce jej rast a porovnáva výsledky rôznych výskumov. V experimentálnej časti práce bol pozorovaný rast riasy v rôznych podmienkach. Bol porovnávaný priebeh kultivácie v autotrofnom a heterotrofnom médiu. Ďalej bol sledovaný rast organizmu v závislosti od teploty a intenzity svetla. Pokus bol prevedený v rôznych kombináciách týchto dvoch rastových faktorov. Výsledky experimentu boli zhodnotené pomocou stanovenia dosiahnutej koncentrácie biomasy a merania absorbancie za použitia spektrofotometrickej metódy.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

mikroriasy, chlorella, kultivácia, rastové faktory

## **ABSTRACT**

The bachelor's thesis is focused on cultivation of *Chlorella* microalgae species. Theoretical part deals with microalgae characteristics, their usage and methods of their cultivation. It is focused on the most important growth factors of chlorella and compares findings from earlier studies. Experimental part contains observations of microalgae growth in different environments and behavioural comparison of autotrophic and heterotrophic cultures. Next, the influence of temperature and light intensity on microalgae growth was observed, using different combinations of these factors. Experimental findings were evaluated from gained biomass concentration and absorbance determined by spectrophotometric method.

## **KEY WORDS**

microalgae, *Chlorella*, cultivation, growth factors

JANKOVIČOVÁ, K. *Problematika produkce řas rodu Chlorella v průtočných bioreaktorech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 39 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Tomáš Svěrák, CSc..

## **PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne, a že všetky použité literárne zdroje sú správne a úplne citované. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....

Podpis študenta

## **POĎAKOVANIE**

Rada by som poďakovala prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc., doc. Ing. Tomášovi Svěrákovi, CSc. a vedeniu firmy Ecofuel Laboratories za pomoc pri realizácii experimentálnej časti bakalárskej práce. Veľká vďaka patrí aj Ing. Dane Byrtusovej za jej ochotu, pomoc a cenné rady pri vypracovaní práce.

# OBSAH

1. ÚVOD.....	3
2. TEORETICKÁ ČASŤ .....	4
2.1. Charakteristika rias rodu chlorella.....	4
2.1.1. Druhy.....	4
2.2. Využitie .....	5
2.2.1. Chlorella v potravinárstve a farmácii .....	5
2.2.2. Zdroj ropy a bionafty.....	6
2.3. Metódy kultivácia rias .....	6
2.3.1. Kultivácia v otvorenom systéme .....	7
2.3.2. Kultivácia v bioreaktoroch .....	7
2.3.3. Vsádková kultivácia .....	9
2.3.4. Kontinuálna kultivácia .....	9
2.3.5. Fed batch kultivácia .....	10
2.3.6. Autotrofná kultivácia.....	10
2.3.7. Heterotrofná kultivácia.....	11
2.4. Rastová krivka .....	11
2.5. Faktory ovplyvňujúce rast mikrorias .....	12
2.5.1. Živné médium .....	12
2.5.2. Svetlo.....	13
2.5.3. pH.....	15
2.5.4. Teplota.....	15
2.5.5. Miešanie .....	16
2.5.6. CO <sub>2</sub> ako zdroj energie .....	17
2.5.7. Riediaci rýchlosť .....	18
3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	19
3.1. Použité chemikálie, prístroje a mikroorganizmy .....	19
3.1.1. Použité chemikálie .....	19
3.1.2. Použité prístroje.....	19
3.1.3. Použité mikroorganizmy .....	20
3.2. Kultivačné média .....	20

3.3. Použité metódy .....	22
3.3.1. Fotoautotrofná kultivácia mikrorias .....	22
3.3.2. Heterotrofná kultivácia .....	22
3.3.3. Optimalizáciu rastu .....	22
3.3.4. Stanovenie biomasy .....	23
3.3.5. Extrakcia karotenoidov .....	23
4. VÝSLEDKY A DISKUSIA .....	25
4.1. Fotoautotrofná kultivácia .....	25
4.2. Heterotrofná kultivácia .....	26
4.3. Porovnanie fotoautotrofnej a heterotrofnej kultivácie .....	27
4.4. Optimalizácia rastu .....	28
4.5. Extrakcia karotenoidov .....	32
5. ZÁVER.....	33
6. ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV .....	34
7. PRÍLOHY.....	39

## 1. ÚVOD

Mikroriasy sú jednobunkové fotosyntetizujúce organizmy nachádzajúce sa vo vodnom prostredí. Sú využívané ako zdroj pre výrobu rôznych produktov, ako sú doplnky bohaté na proteíny, farmaceutika či pigmenty využívané v potravinárstve a kozmetike. Výhodou mikrorias je, že ich rast je oproti ostatným rastlinám rýchlejší a mnoho druhov je navyše bohatých na oleje, čo z nich robí skvelých kandidátov na produkciu biopalív.

Palivá tvoria veľký podiel celosvetovej spotreby energie. Vývoj alternatívnych pohonných látok za účelom redukcie emisií a obmedzenia ich vplyvu na klimatické zmeny - skleníkový efekt a globálne otepľovanie, je v týchto časoch veľkou výzvou spoločnosti. Biopalivá z mikrorias majú nižší dopad na životné prostredie a svetové zásoby jedla ako konvenčné plodiny produkujúce biopalivá.

Mikroriasy predstavujú vo všeobecnosti obnoviteľný a ekologicky priateľský a nezávadný zdroj pre produkciu rôznych bio-produktov. Špecifickou výhodou mikrorias je, že prispievajú k redukcii uhlíka počas rozmnožovania a rastu. Na jednu libru (0,45 kg) vypestovanej biomasy sa totiž spotrebuje 1,8 libier (0,82 kg) CO<sub>2</sub> z atmosféry.

Snahou dneška je znížiť náklady na kultiváciu rias. Proces pestovania, zberu a spracovania je totiž energeticky aj cenovo veľmi náročná. Zvlášť pre produkciu biopalív sú súčasné kultivačné a procesné metódy ekonomicky neúnosné. Na základe týchto poznatkov vznikli rady štúdií zaoberajúce sa optimalizáciou podmienok kultivácie rias. Optimalizácia niektorých faktorov, kultivácie, ako napríklad živín, či svetla, by mohla významne znížiť produkčné náklady a zvýšiť tak ekonomiku následného spracovania produktu [1,8].



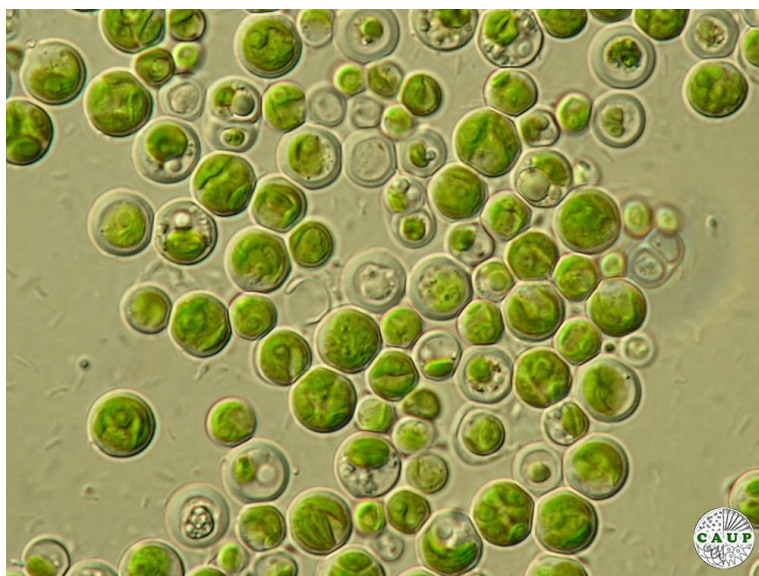
## 2. TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1. Charakteristika rias rodu chlorella

Chlorella je rod sladkovodných jednobunkových rias. Tak ako všetky mikroriasy, aj Chlorella sa zaraďuje k mikroskopickým fotosyntetizujúcim organizmom. Skladá sa z eukariotickej bunky, z čoho vyplýva, že obsahuje organely ako sú chloroplasty, jadro, atď. Mikroriasy vo všeobecnosti dokážu využívať slnečné svetlo, CO<sub>2</sub>, vodu a iné živiny viac efektívne ako suchozemské rastliny. To vedie k produkcii väčšej biomasy, vyššiemu výťažku a rýchlejšiemu rastu. Chlorella dokáže rásť v rôznych vodných prostrediach a môže sa pestovať bez použitia hnojiva a pesticídov, čoho výsledkom je menšie znečistenie prostredia [1, 2].

#### 2.1.1. Druhy

V rámci rodu chlorella rozlišujeme viac ako 20 druhov. Každý z nich sa líši v spôsobe rastu a rozmnožovania. Medzi najznámejšie druhy patrí: *C. vulgaris* (viď Obrázok 1), *C. ellipsoidea*, *C. sacchrophila*, *C. pyrenoidosa* a *C. regularis*. Najväčšími producentami chlorelly je Japonsko (*C. vulgaris*) a Taiwan (*C. pyrenoidosa*). V rámci druhov treba rozlišovať aj poddruhy, respektíve kmene, ktorých je nespočetné množstvo [3].



Obrázok 1: *Chlorella vulgaris* [45]

Do Českej republiky sa najviac dovážala chlorella z Taiwanu a Číny. Bohužiaľ, táto surovina vykazovala nevalné laboratórne rozbery, pretože prostredie, v ktorom bola pestovaná, bolo silne znečistené. To bol jeden z dôvodov prečo sa začala kultivovať na pracovisku MBÚ v Třeboni v čistej vode v kaskádovom systéme [4].



Obrázok 2: Centrum pestovania riasy chlorella v Třeboni [46]

## 2.2. Využitie

Riasy reprezentujú obnoviteľnú a environmentálne neškodnú zásobu pre produkciu mnohých vysokohodnotných bioproduktov a biopalív. Hlavnou výhodou mikrorias je, že počas svojej produkcie pohlcujú uhlík vo forme  $\text{CO}_2$ . Na jednu libru (0,45 kg) vypestovanej biomasy sa totiž spotrebuje 1,8 libier (0,82 kg)  $\text{CO}_2$  z atmosféry. Z rias je možné vyrábať rôzne druhy biopalív, v závislosti na druhu a zložení buniek rias. Niektoré riasy sú využívané v potravinárstve alebo farmácii ako výživové doplnky, v kozmetickom priemysle alebo ako zdroj čistenia odpadových vôd [8].

### 2.2.1. Chlorella v potravinárstve a farmácii

Chlorella je bohato využívaná ako doplnok v strave kvôli vysokému obsahu vitamínov a minerálov. V sušine obsahuje 45% proteínov, 20% tukov, 20% cukrov, 5% vlákniny a 10% minerálov a vitamínov (obsahuje všetky vitamíny B komplexu). Tieto hodnoty sú len približné a v rámci každého druhu sa môžu líšiť [36].

*Chlorella vulgaris* je veľmi bohatá na esenciálne i neesenciálne aminokyseliny. Ako ukážka slúži Tabuľka 1.

Tabuľka 1: Profil obsahu aminokyselín u rôznych kmeňov *Chlorelly vulgaris* v porovnaní s inými zdrojmi v gramoch na 100 gramov proteínu [14]

Aminokyselina	C. vulgaris <sup>b</sup>	C. vulgaris <sup>a</sup>	C vulgaris <sup>c</sup>	Vajíčka	Sója
Kyselina asparágová	9,30	10,94	9,80	11,00	1,30
Treonín	5,30	6,09	5,15	5,00	4,00
Serín	5,80	7,77	4,32	6,90	5,80
Kyselina glutámová	13,70	9,08	12,66	12,60	19,00
Glycín	6,30	8,60	6,07	4,20	4,50
Alanín	9,40	10,90	8,33	—	5,00
Cystein	—	0,19	1,28	2,30	1,90
Valín	7,00	3,09	6,61	7,20	5,30
Metionín	1,30	0,65	1,24	3,20	1,30
Izoleucín	3,20	0,09	4,44	6,60	5,30
Leucín	9,50	7,49	9,38	7,00	7,70
Tyrozín	2,80	8,44	3,14	4,20	3,20
Fenylalanín	5,50	5,81	5,51	5,80	5,00
Histidín	2,00	1,25	1,97	2,40	2,60
Lyzín	6,40	6,83	6,68	5,30	6,40
Arginín	6,90	7,38	6,22	6,20	7,40
Tryptofán	—	2,21	2,30	1,70	1,40
Ornitín	—	0,13	—	—	—
Prolín	5,00	2,97	4,90	4,20	5,30

### 2.2.2. Zdroj ropy a bionafty

Zvyšovanie emisií CO<sub>2</sub> vyžaduje rozvíjanie alternatívnych palív – biopalív, z ktorých majú bionafta a bioethanol momentálne najväčší potenciál na trhu. Biodiesel je populárnou alternatívou k naftovým dieslom a môže sa využívať v klasických dieslových motoroch. Je ekologicky nezávadný, netoxický a vďaka nízkemu obsahu sírnych zlúčenín produkuje menej emisií než klasický diesel. Súčasná dodávka biodiesla vyrobeného z oleja z plodín, doplneného o malý obsah zvieracieho tuku a použitého jedlého oleja, predstavujú asi len 0,3 % (cca. 12 miliónov ton v roku 2007) celosvetovej spotreby ropy a ani zďaleka sa nepribližuje k súčasnému a budúcemu dopytu pohonných hmôt. Biopalivá druhej generácie (systém palív z mikrorias a lignocelulózy) však majú potenciál prekonať mnohé z týchto obmedzení [16, 17].

Niektoré kmene mikrorias dokážu vyprodukovať 15 až 300krát viac oleja pre produkciu bionafty na plochu, než klasické plodiny využívané na produkciu oleja. Mikroriasy majú tiež nižší priemerný cyklus zberania „úrody“, a to 10 dní, zatiaľ čo tradičné plodiny sa zbierajú jeden, maximálne dvakrát do roka. Ak by sa brali do úvahy nejedlé oleje ako napríklad olej z mikrorias, cena bionafty by mohla klesnúť [17, 18].

### 2.3. Metódy kultivácia rias

Kultivácia je umelý spôsob rozmnožovania organizmov. Rozmnožovanie prebieha v predom určenom kultivačnom médiu. Existuje viacero rozdelení kultivácie. Medzi tie najzákladnejšie

patrí rozdelenie podľa prísunu živín vo forme média do kultúry v rámci ktorého rozlišujeme tri typy kultivácie: vsádková, fed-batch a kontinuálna kultivácia. Ďalším dôležitým rozdelením je rozlíšenie zdroju uhlíka v médiu. To môže byť kultivácia autotrofná, kedy organizmus využíva ako zdroj energie anorganický uhlík, alebo kultivácia heterotrofná, v ktorej organizmus spotrebúva organický uhlík, napríklad vo forme glukózy. Možno ju rozčleniť aj podľa zariadenia, resp. prostredia, v ktorom prebieha – na kultiváciu v uzavretom systéme (bioreaktor) alebo v otvorených systémoch, napríklad nádržiah.

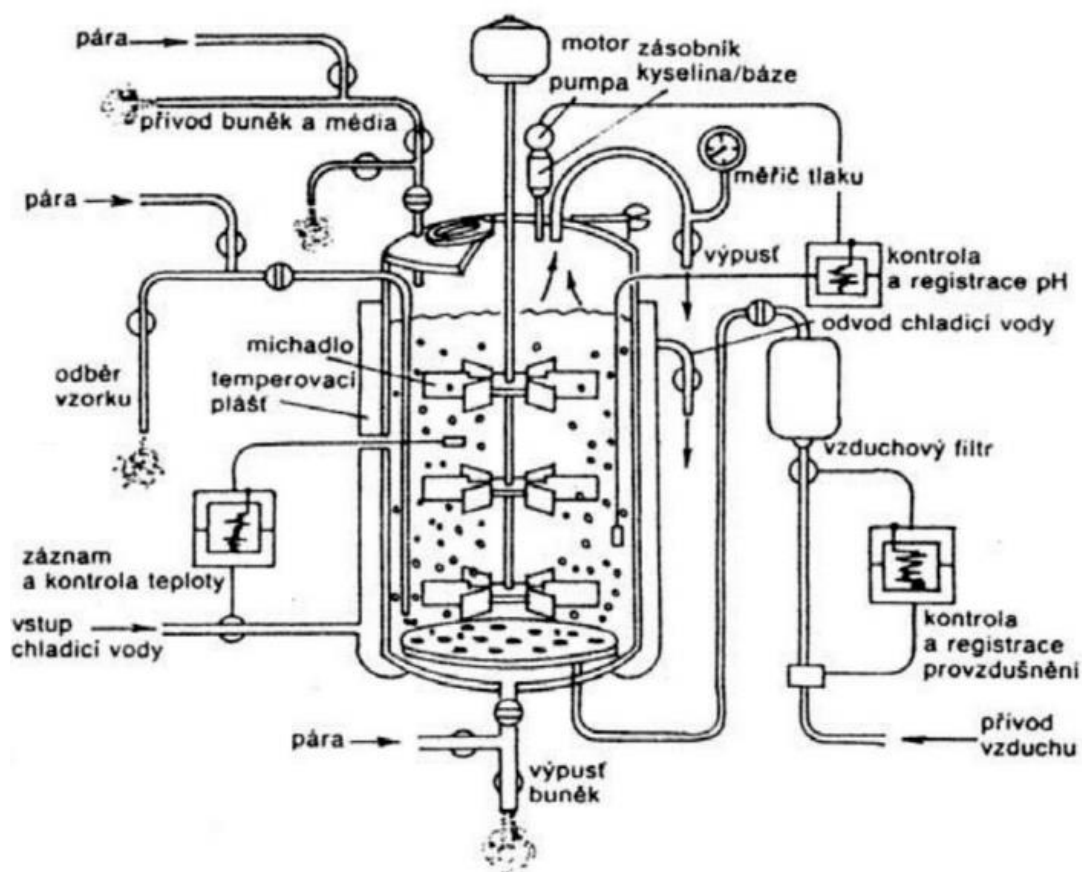
### **2.3.1. Kultivácia v otvorenom systéme**

Riasy sa môžu pestovať vo vonkajšom prostredí, najčastejšie v nádržiah, a energiu získavajú zo slnečného žiarenia. Kultivácia v otvorených vodných nádržiah určená na produkciu biomasy za účelom výroby potravinárskych výrobkov, proteínov a  $\beta$ -karoténu je jedna z najstarších metód, datujúc svoj vznik k 50. rokom minulého storočia. Hoci sú náklady na prevádzku a konštrukciu takýchto nádrží pomerne nízke, majú radu nevýhod. Jednou z nich je slabý a nerovnomerný rozptyl svetla v nádrži, ktorý klesá s hĺbkou. Rozptyl svetla sa tiež zhoršuje s nárastom a zvyšovaním koncentrácie buniek, pretože dochádza k tzv. samotieneniu, kedy si bunky navzájom tienia. Medzi ďalšie nevýhody patrí napríklad častá kontaminácia, nepredvídateľnosť počasia, vysoké náklady na zber produktu a mnohé iné [7].

### **2.3.2. Kultivácia v bioreaktoroch**

Bioreaktory vznikli ako alternatíva ku kultiváciám v otvorených nádržiah. Tie môžu byť umiestnené vonku alebo vnútri. Svetlo je väčšinou dodávané pomocou umelého elektrického osvetlenia, preto sú tieto zariadenia častejšie referované ako fotobioreaktory. Pojem „fotobioreaktor“ sa používa len v súvislosti s uzavretým systémom, teda takým pri ktorom nedochádza k výmene látok medzi vonkajším prostredím (plyny, kontaminanty) a vnútorným prostredím - kultúrou, ktorá sa v takomto bioreaktore pestuje. Tieto zariadenia poskytujú ochranné prostredie pre kultivovaný druh, relatívne bezpečné pred kontamináciou od iných mikroorganizmov a navyše sa v ňom lepšie udržujú stále podmienky ako napríklad pH, koncentrácia  $\text{CO}_2$  a kyslíku alebo teplota. Navyše zabráňujú vyparovaniu vody, takže sa znižuje aj jej spotreba. Ďalšími výhodami sú aj menšie straty  $\text{CO}_2$ , vyššie koncentrácie buniek organizmu, teda v konečnom dôsledku znižujú nároky na finančné výdaje a dosahujú vyššiu úroveň produkcie. Aj napriek týmto výhodám, sú bioreaktory finančne náročnejšie na výrobu a prevádzku v porovnaní s nádržami. Vyžadujú totižto chladenie, striktnú kontrolu prívodu kyslíka a nečistôt. Tým pádom sa ich využitie v praxi obmedzuje hlavne na produkciu vysokohodnotných výťažkov z rias, ktoré sa nedajú pestovať v otvorenom priestore. [5, 6, 10]

Používanie fotobioreaktorov sa datuje k neskorým štyridsiatym rokom 20. storočia. Vznikli ako výsledok skúmania princípov fotosyntézy vykonávaný riasou rodu *Chlorella* [10].



Obrázok 3: Schematické zobrazenie zostavy bioreaktoru

### 2.3.2.1. Druhy fotobioreaktorov

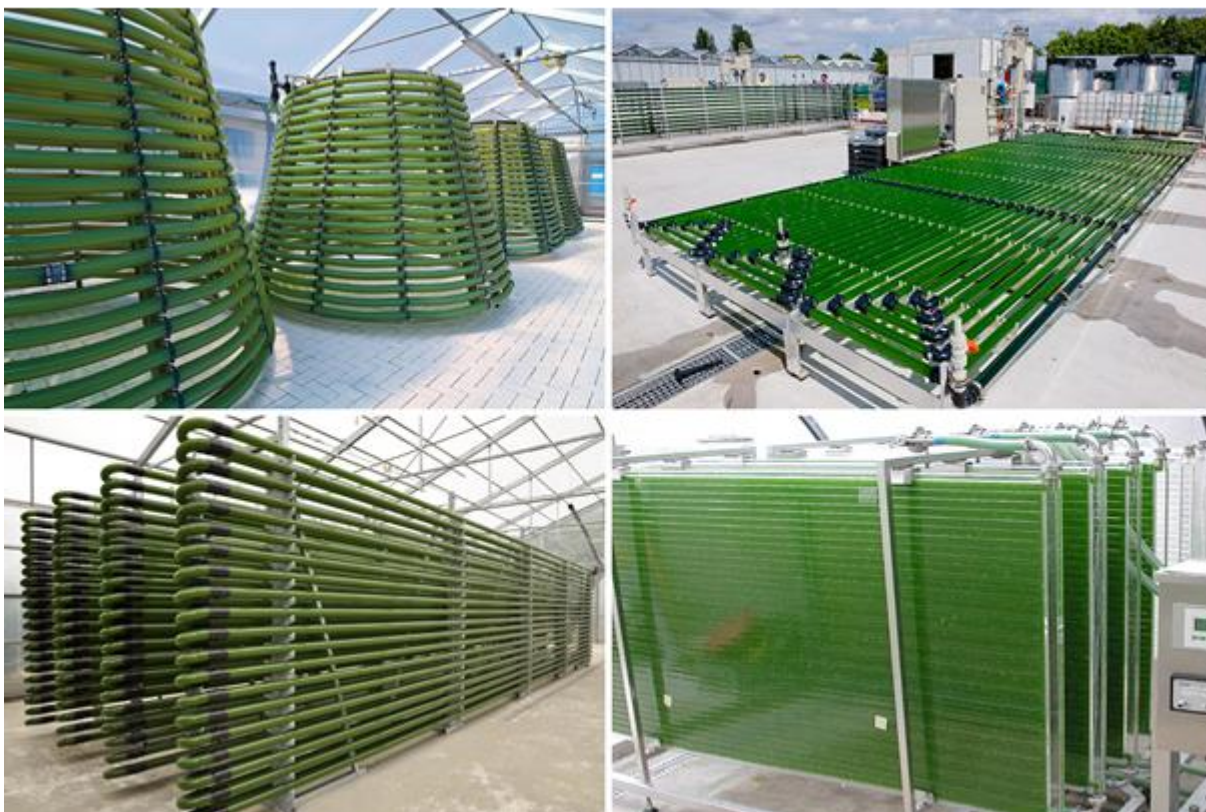
Existujú rôzne kategórie fotobioreaktorov ako napríklad tubulárne alebo plošné fotobioreaktory, vertikálne, stĺpcové, horizontálne, naklonené alebo špirálovité, s premiešavaním pomocou pumpy alebo vzduchu, jednofázové, naplnené suspenziou kultúr, s výmenou vzduchu v oddelenom výmenníku, alebo dvojfázové [10].

Plošné fotobioreaktory sú kvádrového tvaru s maximálnou svetelnou dráhou. Sú vyrobené z priehľadných materiálov, ako je sklo, plexisklo či polykarbonát. Vyznačujú sa vysokým pomerom plochy povrchu k objemu a agitácia je zaistená prebublávaním vzduchu perforovanou trubicou pomocou pumpy [12].

Tubulárne fotobioreaktory sa vyskytujú buď v horizontálnom alebo vertikálnom (tiež zvané airlift fotobioreaktory) usporiadaním. Ide o súbor priehľadných trubíc, ktoré umožňujú prienik svetla. Miešanie je zaistené prebublávaním plynu alebo zmesi plynov [12].

Pre veľkoobjemovú kultiváciu sú najviac vhodné tzv. bubble columns a tubulárne bioreaktory. Tubulárne typy reaktoru disponujú lepšou dostupnosťou svetla.





Obrázok 4: Hore zľava - "Christmas tree" fotobioreaktor, tubulárny horizontálny fotobioreaktor, dole zľava – tubulárny vertikálny fotobioreaktor a plošný fotobioreaktor [49 - 51]

### 2.3.3. Vsádková kultivácia

Táto metóda spočíva v jednorazovom naočkovaní buniek do nádrže. V praxi sú riasy prevedené na väčšie objemy pred začatím stacionárnej fázy. Keď kultúra dosiahne maximálnu hustotu, zozbiera sa. V takýchto podmienkach je rast mikroriasy charakterizovaný tzv. rastovou krivkou. [8, 9]

Nádoby, v ktorých sa takáto kultivácia prevádza môžu byť nasledujúce: skúmavky, banky (2 l), 5 a 20 l demižóny, 160 l valce, 500 l vnútorné nádrže, 5 000 l až 25 000 l vonkajšie nádrže, atď [9].

### 2.3.4. Kontinuálna kultivácia

Kontinuálny kultivačný systém sa využíva hlavne v industriálnom a vedeckom odvetví. Objav takéhoto spôsobu kultivácie sa datuje k päťdesiatym rokom 20. storočia, kedy bol zostrojený prvý chemostat, tiež nazývaný baktogen [10].

Je to spôsob, kedy sú kultúre nepretržite dodávané živiny (napr. v podobe čerstvého média) a zároveň sa kontinuálne vyplavujú kultúry nadbytočné. Pomocou tejto metódy sa udržiava systém kultúr veľmi blízko maximálnej rýchlosti rastu. Nevýhodou metódy je jej relatívne vysoká cena a komplexnosť. Požiadavky na konštantné osvetlenie a teplotu limitujú využitie prietokových systémov len na používanie v interiéri, čo je praktické len pri výrobe malých objemov produktu. I napriek tomu je tento spôsob výhodný, pretože u takto vyprodukovaných rias je ich kvalita predvídateľná. Okrem toho, takéto kultúry podliehajú technickej kontrole a automatizácii, čo zvyšuje spoľahlivosť systému a znižuje množstvo pracovnej sily. [9, 10]

V rámci kontinuálnej kultivácie rozlišujeme dva typy:

- Kultivácia v turbidistate, do ktorého sa privádza čerstvé médium iba v prípade, že hustota buniek dosiahne predom určený hodnotu. Tá sa meria pomocou množstva úbytku svetla prechádzajúceho cez kultúru. Po docielení daného bodu sa do kultúry pridá určitý objem čerstvého média a rovnaký objem kultúr sa odoberie. Hustota buniek zriedenej kultúry opäť rastie a celý proces sa opakuje.
- Kultivácia v chemostate, do ktorého sa privádza stály prúd čerstvého média v predom určenej rýchlosti. Obmedzený prídavok životne dôležitých živín (napr. dusík) v pevne stanovenej rýchlosti zaisťuje, že nie hustota buniek, ale rýchlosť rastu je konštantná. V chemostate je teda určovaná hustota buniek a rýchlosť rastu práve prídavkom média [10, 11].

Pri kultivácii v chemostate je živné médium väčšinou dodávané do kultúry konštantnou rýchlosťou pomocou peristaltickej pumpy alebo elektromagnetickej brány (solenoidu). Rýchlosť prúdenia média sa môže rôzne upravovať a najčastejšie je nastavená na približne 20% objemu kultúry na deň. Vzduch sa pumpuje do nádoby cez sterilný filter. Takýto systém bublinkového vzduchu má tri efekty: zásobuje kultúru  $\text{CO}_2$  a  $\text{O}_2$ , spôsobuje cirkuláciu a mieša kultúru a zvyšuje tlak vo vnútri priestoru hlavy kultivačnej nádoby tak, aby sa sila na odstránenie určitého množstva média (a buniek) rovnala objemu prichádzajúceho média. Magnetická miešacka a privádzaný vzduch zabraňujú, aby sa bunky zachytávali na dne nádoby. Právě prietokové kultivácie by mali mať zabezpečený prívod média v konštantnom objeme za minútu. Niektoré privádzacie systémy ako sú peristaltická pumpa alebo solenoidná brána však nie sú stopercentne spoľahlivé [10].

### **2.3.5. Fed batch kultivácia**

Pri takomto spôsobe kultivácie sa prevedie čerstvé médium do kultúry celé naraz, prostým otvorením ventilu na prívode, ktorým prechádza médium. Čerstvé médium tečie do kultivačnej nádoby a po nadávkovaní žiadaného množstva sa ventil jednoducho zavrie a kultúra môže rásť 24 hodín, pokiaľ sa celý proces nezopakuje znova. Médium je neustále prevzdušňované a premiešavané, napríklad na trepačke. Vďaka tejto metóde sa dokáže predĺžiť kultivácia vo veľkých nádržiach práve vďaka pravidelnému zbieraniu produktu, po ktorom nasleduje okamžité doplnenie na pôvodný objem a tiež doplnenie zásoby živín na úroveň pôvodných zásob. Táto metóda sa môže používať vo vonkajšom aj vo vnútornom prostredí. Vo vonkajšom prostredí je však trvácnosť tejto metódy je často nepredvídateľná, pretože nakoniec dôjde vždy k vytvoreniu rôznych predátorov, kontaminantov či konkurentov v prostredí, čo spôsobí, že kultúra nie je ďalej vhodná na ďalšie použitie. Tým, že produkt sa nezozbiera všetok, ako je tomu pri statickej kultivácii, dosahuje táto metóda vyšší výťažok rias. [10,12]

### **2.3.6. Autotrofná kultivácia**

Autotrofná kultivácia, nazývaná aj fotoautotrofná, je dnes asi najčastejšou metódou pestovania rias. Je to dané tým, že všetky mikroriasy sú fotosyntetizujúce organizmy. Bunky rias zachytávajú slnečnú energiu a ako zdroj uhlíka využívajú  $\text{CO}_2$ . Najväčšou limitáciou tohto spôsobu kultivácie je svetlo, na ktorom závisí rast a zvyšovanie hustoty buniek. Platí, že čím

viac svetla na kultúru pôsobí, v rámci určitého intervalu, po ktorého prekročení začne mať svetlo inhibičné účinky, tým rýchlejšie rastie [7].

### **2.3.7. Heterotrofná kultivácia**

Možnou alternatívou k autotrofnej kultivácii, avšak použiteľná len pre určité percento druhov mikrorias, je využitie ich schopnosti heterotrofného rastu pri absencii svetla, kedy sa fixácia atmosférického CO<sub>2</sub> nahrádza zdrojom organického uhlíka rozpusteného v kultivačnom médiu. Heterotrofia je definovaná ako využitie organických zložiek na rast. Heterotrofné organizmy sú také, ktoré čerpajú energiu a potrebné substráty z organických látok vytvorených inými organizmami. Zloženie kultivačného heterotrofného média je podobný tomu autotrofnému, s výnimkou prídavku organického uhlíka [7].

Vďaka tomu, že pre heterotrofný rast rastlín nie je potrebný zdroj svetla, je možné kultivovať riasy v podstate v hocijakom bioreaktore. To predstavuje veľkú výhodu oproti autotrofnej kultivácii. V niektorých prípadoch heterotrofného rastu možno dosiahnuť hustotu buniek 50 – 100 gramov suchej biomasy na liter. Treba zdôrazniť, že sa nejedná o výnimku, ale o kultiváciu, ktorú možno opakovať. Táto hodnota zďaleka presahuje maximum dosiahnuté pri autotrofnej kultivácii – 30 g.l<sup>-1</sup>. Vďaka vysokej výťažnosti heterotrofnej kultivácie sa táto metóda stala finančne menej náročnou v porovnaní s autotrofnou kultiváciou. Pre predstavu, v roku 1996 v Japonsku, ktoré je popredným producentom chlorelly, až 50% vyprodukovanej biomasy, teda cca. 500 ton, pochádzalo práve z heterotrofnej kultivácie [7].

Heterotrofná kultivácia má však aj radu nevýhod. Existuje len určitý limitovaný počet druhov rias, schopných heterotrofného rastu, riziko kontaminácie v heterotrofnom prostredí je pomerne vysoké alebo neschopnosť produkcie svetlom indukovaných metabolitov. S heterotrofnou kultiváciou tiež odpadá možnosť redukcie CO<sub>2</sub> v atmosfére [7].

Existuje rad výskumov zaoberajúcich sa porovnávaním rýchlosti rastu rias v heterotrofných a autotrofných podmienkach. Ukazuje sa, že druhy rodu chlorella, tetraselmis a nitzschia rastú rýchlejšie práve v heterotrofných podmienkach [7].

## **2.4. Rastová krivka**

Prvou fázou rastu mikroorganizmov je takzvaná lag fáza, alebo aj aklimatizačná fáza. Táto fáza nastáva po prenose do čerstvého média a nárast hustoty buniek je veľmi malý. Toto „meškanie“ rastu je pripisované fyziologickej adaptácii metabolizmu bunky na rast v novom prostredí a je sprevádzané mnohými faktormi, ako napríklad naviazanie uhlíka alebo zvyšovanie hladiny enzýmov a metabolitov zúčastňujúcich sa na delení buniek.

Za lag fázou nasleduje exponenciálna fáza, inak nazývaná aj log fáza. Je to fáza, kedy sa bunky začnú deliť a nastáva rast. Platí tu závislosť logaritmu množstva mikroorganizmov (počtu buniek) v jednotkovom objeme na čase lineárna.

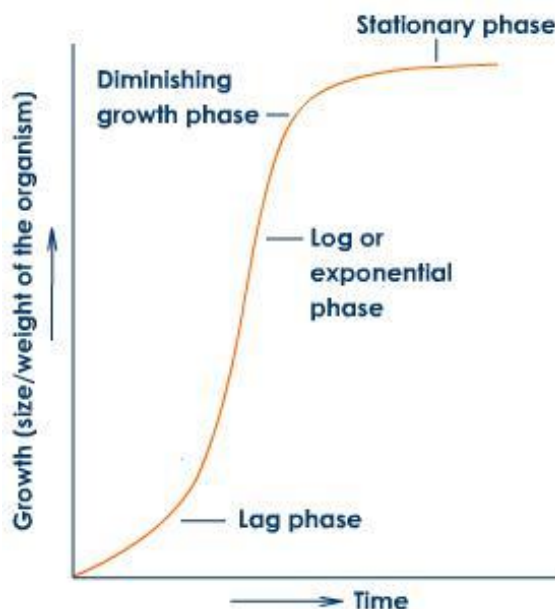
Jav, kedy sa delenie buniek začne spomaľovať nazývame fázou poklesu rýchlosti rastu. Spomalenie je spôsobené tým, že sa začnú vyčerpávať živiny, dôjde k negatívnej zmene pH alebo iným chemickým či fyzickým zmenám.

Štvrtá fáza nastáva pri dosiahnutí rovnováhy medzi limitujúcimi faktormi rastu a rýchlosťou rastu buniek. Dochádza k relatívne konštantnej hustote buniek. Fáza sa nazýva stacionárna fáza.



Počas poslednej fázy sa zhorší kvalita vody a živiny sú natoľko ochudobnené, že nedokážu viac podporovať rast a delenie buniek. Hustota buniek prudko klesá až dôjde k úplnému kolapsu kultúry. [8, 9]

Priebeh rastu môžeme pozorovať buď pomocou spektrofotometrických metód, napríklad meraním absorbancie, alebo stanovovaním množstva suchej biomasy v čase.



Obrázok 5: Rastová krivka [52]

## 2.5. Faktory ovplyvňujúce rast mikrorias

Riasy nie sú náročné organizmy a možno ich kultivovať hocikde aj pri použití malého množstva živín. Ideálne podmienky pre rast sa líšia v závislosti na druhu a kmeni a produkcia biomasy závisí na mnohých faktoroch. Patria sem abiotické faktory, ako napríklad teplota, minerály, oxid uhličitý, pH, kvalita vody, intenzita a cyklus svetla. Biotické faktory zahŕňajú citlivosť buniek a ich hustotu. K mechanickým faktorom patrí miešanie, veľkosť bubliniek vzduchu a distribúcia a prenos masy. Všetky tieto faktory sa týkajú kultivácie vo fotobioreaktoroch [23].

### 2.5.1. Živné médium

Zloženie živného média má nesmierny efekt ako na rast tak aj na finálnu koncentráciu mikrorias. U mikrorias je známe, že najhojnejší rast prebieha v nutrične bohatých (eutropických) vodách, v ktorých často dochádza ku kvitnutiu rias [17].

V štúdiu z roku 2011 pozoroval Feng a spol. výrazný úbytok amoniaku (vo forme  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) z synteticky vyrobenej znečistenej vode počas 3 dní kultivácie. Rast *Chlorella vulgaris* však nebol týmto úbytkom limitovaný, čo potvrdzuje domnienky, že mikroriasy najprv spotrebujú dusík z amoniaku a až potom dusík z dusičnanov prítomných v naočkovanej látke [24].

Naopak zmeny koncentrácie dusičnanov (napríklad  $\text{KNO}_3$ ) v kultivačnom médiu vykazovali malý efekt na koncentráciu biomasy u rôznych kmeňov chlorelly. Najnižšia testovaná koncentrácia bola 1,24 g/l a bola dostačujúca na podporu rastu [25].

Podľa viacerých štúdií, prídavok  $\text{NaHCO}_3$ , resp. zvýšenie jeho koncentrácie, podporuje rast *C. vulgaris* a vedie k zvýšeniu jej biomasy. Štúdiá publikovaná v roku 1982 ukázala, že už relatívne malé koncentrácie  $\text{NaHCO}_3$  (0,5 M, resp. 4,2 g/l) v kombinácii s prebublávaním vzduchu obohateným o  $\text{CO}_2$  (1,5%) podporili rast *C. vulgaris* v zmiešanej kultúre so *Spirulinou platensis*, nezávisle na pH (8,5 – 9). Ďalší výskum z roku 2011 ukázal podobné výsledky u *C. vulgaris*, pri koncentrácii 3,36 g/l  $\text{NaHCO}_3$ , kedy výťažok dosiahol 0,67 g/l suchej biomasy. Prídavok  $\text{NaHCO}_3$  do BM (Basal medium) preukázal zvýšenie produkcie biomasy *C. vulgaris* v koncentračnom rozmedzí od 0,1 - 1,6 g/l, a so stúpajúcou koncentráciou  $\text{NaHCO}_3$  stúpala aj koncentrácia produktu. Maximum koncentrácie biomasy (0,6 g/l) nastal pri koncentrácii 1,2 g/l  $\text{NaHCO}_3$ . Najvyššia rýchlosť rastu a produkcie lipidov v prípade chlorelly boli zaznamenané pri koncentrácii 75 mg/l  $\text{NaHCO}_3$  a koncentrácii  $\text{CO}_2$  o 4758 ppm. [26 - 29]

Medzi najčastejšie používané médiá patrí BBM (Bold's Basal Medium), BG11 - médium (Blue – Green Medium), SGM (synthetic wastewater medium), WC médium, Chu #10 médium, V médium atď. Keďže najviac výskumov sa prevádza práve v BBM a BG11, bude táto práca zameraná hlavne na štúdie, v ktorých boli použité tieto médiá. Mnoho štúdií sa tiež zaoberá použitím SGM (synthetic wastewater medium), ale keďže táto voda je vždy zozbieraná z iného zdroja a za iných podmienok nemá moc zmysel sa ním zaoberať [5].

BBM prešlo rôznymi modifikáciami a vzniklo mnoho médií založených na báze BBM, pričom každé bolo navrhnuté tak, aby vyhovovalo špecifickým požiadavkám rôznych druhov a kmeňov rias. Medzi najznámejšie patrí 3N – BBM, BBM trojnásobne obohatené o dusičnany, KBBM, BBM + 0,25 % sacharózy + 1,0 % pepton proteóza – produkt hydrolytického štiepenia bielkovín pôsobením proteolytického enzýmu, 3N –BBM obohatené o vitamíny, atď.

Pri pokuse z roku 2013 porovnával M.F. Blair a spol. vplyv zloženia živného média na rast *Chlorelly vulgaris* a to tak, že znížil koncentráciu makronutrientov v modifikovanom 3N – BBM na 25 % a 50 % a porovnával rozdiel so 100% zložením BBM. Zatiaľ čo pri použití 50% a 25% média bola zahájená takmer okamžite log fáza, 100% médium takúto dráhu nezaznamenalo, čo viedlo k predpokladu, že v odporúčanom zložení je koncentrácia niektorých látok zbytočne vysoká. 50% médium udržiavalo log fázu aj v dvanásty deň, 25% vstúpilo do stacionárnej fázy na jedenásty deň. 100% médium dosiahlo najvyšší objem biomasy na 4. deň ( $0,0475 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), 50% na 8. deň ( $0,0525 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) a 25% na 7. deň ( $0,0893 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Najvyššia rastová rýchlosť u 50% a 100% média bola rovnaká a nastala v 4. deň u oboch prípadov ( $0,38 \text{ d}^{-1}$ ). Experiment trval 12 dní, použité bolo biele svetlo. Pokus s 50% médiom bol predĺžený na 14 dní a kultúra bola v stave log fázy aj v 14. deň. Z experimentu vyplýva, že 50% zloženie média je dostačujúce a jeho redukcia je ďalším krokom k zníženiu finančnej náročnosti pestovania chlorelly [8].

Treba zvýrazniť fakt, že každý druh a kmeň riasy rastie za iných optimálnych podmienok, preto je ťažké porovnávať efekt BBM a BG. Avšak väčšina štúdií na ktoré som zatiaľ narazila dokazujú, že v BG je rast buniek lepší (Held 2011, Munir 2015).

### 2.5.2. Svetlo

Mikroriasy sú fotosyntetizujúce organizmy, spotrebúvajú anorganický uhlík a premieňajú ho na organické látky. Svetlo je zdroj energie, ktorá poháňa túto reakciu s ohľadom na jeho

intenzitu a kvalitu spektra. Považujúc svetlo za najdôležitejší zdroj energie u fotoautotrofných rias, vzniklo veľa štúdií zameriavajúcich sa na vplyv intenzity svetla. To, že svetlo je esenciálnym faktorom potvrdzuje aj štúdia z roku 2015, kedy Munir a spol. vystavili *Chlorellu sp.* len tme a tá následne nevykazovala žiadne známky rastu. Okrem intenzity je podstatná aj vlnová dĺžka svetla a jeho cyklus. [8, 23]

#### **2.5.2.1. Svetelné cykly**

Dĺžka svetelného cyklu je veľmi dôležitým kritériom, ktoré musí byť zahrnuté pri zostavovaní fotobioreaktoru. Periódys svetla majú významný vplyv na fotosyntézu a rýchlosť rastu, ale treba brať do úvahy, že pri nadmerné vystavenie svetlu dochádza k plytvaniu elektriny a spomaleniu rastu buniek. V porovnaní s 3 h, 6 h a 9 h svetelnými cyklami došlo pri 12 h cykle takmer k zdvojnásobeniu koncentrácie biomasy. Zistilo sa, že rýchlosť rastu a maximálna hustota buniek rias rastie úmerne s dĺžkou svetelného cyklu nezávisle od intenzity svetla. Výnimkou bol cyklus 12:12 h (svetlo : tma), kedy kultúra vykazovala vyššiu produktivitu a maximálne hodnoty hustoty buniek v porovnaní s cyklom 14:10 h (svetlo : tma). [7, 30, 31]

#### **2.5.2.2. Zdroj svetla**

Je známe, že významným faktorom ovplyvňujúcim rast mikrorias je zdroj svetla najmä v dôsledku rozdielného pokrytia spektra vlnových dĺžok. *Chlorella sp.* obsahuje hlavne pigmenty ako je chlorofyl a karotenoidy, ktoré zachytávajú vlnovú dĺžku v rozsahu 400 – 500 nm a 650 – 700 nm. Wolfrámová lampa, ktorej vlnové dĺžky dosahujú 750 – 850 nm je teda horším zdrojom svetla ako fluorescenčná lampa (450 – 650 nm). To je dôvod prečo sú pre rast *Chlorelly vulgaris* vhodnejšie fluorescenčné mapy. Z dvoch typov fluorescenčných lúč, ktorých vplyv na rast *C. vulgaris* pozoroval Kuei-Ling Yeh a spol., sa ako efektívnejšia ukázala helixová lampa. Helixová lampa je zdrojom bodového svetla a v porovnaní s klasickou fluorescenčnou lampou distribuuje svetlo síce intenzívnejšie, ale sústreďuje sa na menšiu plochu. To znamená, že na osvetlenie určitej plochy by bolo potrebné použiť väčšie množstvo helixových ako klasických lúč, čo by sa odrazilo na cene. [32 – 34]

V inom pokuse zrovnával autor vplyv modrého (475 nm), bieleho, zeleného (510 nm) a červeného (650 nm) svetla na rast buniek riasy *Chlorella vulgaris* vo fotobioreaktore. Pri použití červeného a zeleného svetla stačilo 7 dní na to aby prebehol celý rastový cyklus. U týchto dvoch svetiel bola rýchlosť rastu najnižšia. Pre biele a modré svetlo sa pokus predĺžil na 12 dní. V rámci log fázy bol rast u oboch svetiel zrovnateľný, biele svetlo bolo o trochu účinnejšie. Po 10 dňoch rast pod modrým svetlom „dobehol“ rast pod bielym. To dokazuje, že rast pod modrým svetlom sa „zlepší“ po aklimatizačnej fáze. I napriek tomu je však biele svetlo výhodnejšie, pretože modré svetlo vyžaduje viac času na začatie exponenciálnej fázy. To znamená, že pomalý rast pod modrým svetlom nie je zrovna ideálny pre praktické využitie, pretože čím rýchlejšie sa dosiahne log fáza, tým vyššia bude produkcia biomasy a tým častejšie môže prebiehať zber produktu, či už v nádržiach alebo fotobioreaktoroch [8].

Treba brať na vedomie, že každý druh a kmeň riasy chlorella vyžaduje iné podmienky. V inej štúdiu na *C. pyrenoidosa* boli výsledky rovnaké ako vyššie zmienené, ale pre červené svetlo. V iných pozorovaniach bolo dokázané, že čisté červené svetlo môže v skutočnosti poškodzovať bunky. Ak by takéto bunky boli vystavené slabým dávkam modrého svetla, došlo by k ich

obnoveniu. To isté platí pre modré svetlo pri vysokej intenzite, ako zistil Kebede a Ahlgren. Yan a spol. zistili, že červené a biele svetlo spôsobovali u *C. vulgaris* najrýchlejší rast buniek, ich pozorovanie však bolo vykonané medzi 6 – 10 dňom a ako živné médium bolo použité SGM [8].

#### 2.5.2.3. *Intenzita svetla*

Okrem zdroja svetla je tiež veľmi dôležitá i jeho intenzita. Pri skúmaní vplyvu intenzity svetla za použitia TL5 lampy sa rýchlosť rastu buniek *C. vulgaris* začala spomaľovať pri vystavení svetlu o intenzite vyššej ako  $18 \text{ W/m}^2$ . Toto pozorovanie potvrdilo závery zo štúdie z roku 2000, vedené Ogbonom a Tanakom. Najvyššia rýchlosť bola dosiahnutá práve pri svetle o intenzite  $18 \text{ W/m}^2$ , konkrétne  $1,606 \text{ deň}^{-1}$ . Pri intenzite  $9 \text{ W/m}^2$  bolo maximum  $1,301 \text{ deň}^{-1}$ . Z hľadiska efektivity by teda bolo výhodnejšie používať intenzitu  $9 \text{ W/m}^2$ , čím by sa znížili aj náklady na elektrickú energiu. Chang a spol. zase vyhodnotil ako najefektívnejšiu intenzitu  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , čo je približne  $26,16 \text{ W/m}^2$ , kedy rýchlosť rastu dosahovala hodnoty  $1,872 \text{ deň}^{-1}$ , pričom použitá lampa bola tiež fluorescenčná. Iná štúdia tvrdí, že pri použití LED svetla môže byť maximálna intenzita svetla, pri ktorej nedochádza k spomaleniu rastu, až  $400 \text{ W/m}^2$ . Pri takomto osvetlení dosiahol maximálny rast buniek *C. vulgaris* hodnotu  $0,840 \text{ deň}^{-1}$ . Ak by sme porovnali spotrebu a produkt, je táto metóda určite neefektívnejšia a dokazuje iba, že *C. vulgaris* znesie aj väčšiu intenzitu svetla pri inom zdroji osvetlenia. [34, 35, 39]

#### 2.5.3. pH

Hodnota pH, ktorú má kultúra na počiatku môže mať veľký vplyv na koncentráciu biomasy a produkciu lipidov u niektorých kmeňov mikrorias. Pri prekročení pH 9 môže dôjsť dokonca k vyzrážaniu vápenatých solí. Mayo v roku 1997 zistil, že *Chlorella vulgaris* toleruje nízke pH, a dokáže prežiť i pri pH 3. Vyplývajú z jeho výskumu sa riasy darilo najlepšie pri pH 6,31 - 6,84. Maximálne dosiahnuté pH (pH = 11) už na rast *C. vulgais* vplývalo negatívne. V inej štúdii sa ukázalo, riasy všeobecne sa pri pH vyššom ako 8 prestávajú rozmnožovať a rýchlosť rastu klesá. Hodnotu pH ovplyvňuje hlavne živné médium, v prípade BG-11 je to približne 7,4 a u BBM približne 6,6. To je aj dôvod, prečo vo väčšine štúdií narazíme na pH prostredia od 6 – 7,5. [5, 8, 25, 28, 37, 39]

#### 2.5.4. Teplota

Teplota ovplyvňuje rýchlosť všetkých chemických reakcií súvisiacich s metabolizmom a rastom rias. Teplotné zmeny pôsobia na biochemické zloženie buniek, konkrétne lipidov a proteínov. Teploty nad  $30^\circ\text{C}$  negatívne ovplyvňujú rast buniek *Chlorelly sp.* Pri teplote  $35^\circ\text{C}$  začínajú vykazovať pokles rýchlosti rastu asi o 17 %. Zvyšovanie teploty ( $38^\circ\text{C}$ ) vedie k smrti riasových buniek. Bolo dokázané že optimálna teplota pre rast väčšiny druhov rias je medzi  $20^\circ\text{C}$  –  $30^\circ\text{C}$ . Pri inom výskume bol najrýchlejší rast dosiahnutý pri teplote  $32,4^\circ\text{C}$ . Išlo však o *C. vulgaris* kultivovanú v zmiešanej kultúre, pričom hlavnou zložkou živného média bol uhlík v organickej forme – glukóze (koncentrácia  $0,75 \text{ mg/l}$ ). Pri väčšine experimentov sa však udržiava teplota okolo tej laboratórnej, to znamená  $25^\circ\text{C}$ . [8, 38]

*Chlorella* je relatívne citlivá na zmeny teploty. Ak teploty klesnú nízko, má tendenciu spaľovať cenné kalórie. Najlepšie optimum pre jej rozmnožovanie je okolo  $25^\circ\text{C}$ . Z toho

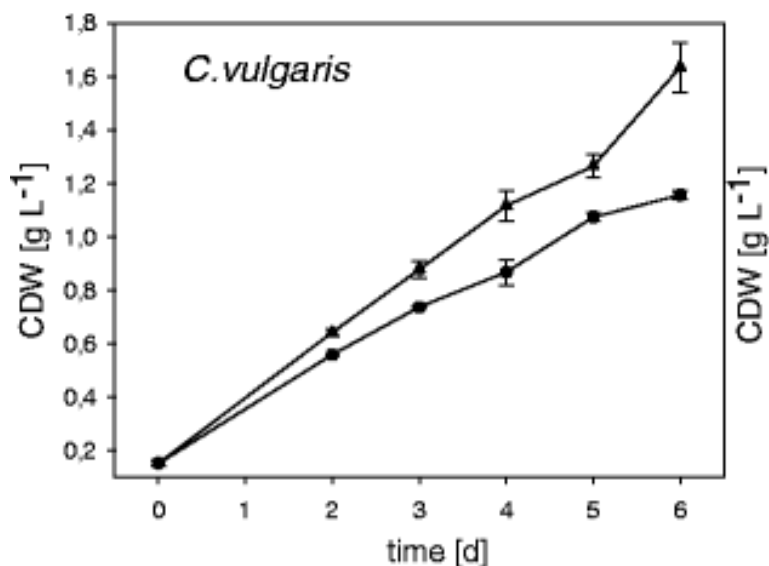
vyplýva, že v noci potrebuje zahrievanie a cez deň klimatizáciu. Je to tiež jeden z dôvodov, prečo je v súčasnosti stále ekonomicky náročné pestovať tieto riasy vo veľkom na účely akými je napríklad výroba biopalív [36].

### 2.5.5. Miešanie

Miešanie je nevyhnutnou súčasťou kultivácie. Zabraňuje sedimentácii riasy a zabezpečuje homogenizáciu kultúry, čo znamená, že všetky bunky majú rovnaký prísun živín a svetla a udržiava sa rovnaké pH a teplota. Je známe, že čím je koncentrácia buniek vo fotobioreaktore väčšia, tým je ťažšie zachovať zmes v homogénnom stave. Z toho vyplýva, že otáčky miešania je treba vhodne regulovať. Miešanie má taktiež pozitívny vplyv na výmenu látok medzi privádzaným vzduchom a kultivačným médiom, predovšetkým oxidu uhličitého. Je však nevyhnutné vedieť aký efekt môže mať rýchlosť miešania na bunky. Príliš veľké otáčky môžu nielen znižovať rýchlosť rastu, ale i poškodzovať riasu inými spôsobmi, ako napríklad spôsobovať únik dôležitých látok z bunky. [9, 44]

Maximálna tolerovaná rýchlosť miešania sa líši v závislosti na použitom kmeni riasy. Závisí taktiež na tom, či skúmame rýchlosť rastu samotnej riasy alebo látky, ktoré produkuje. Napríklad v štúdiu z roku 1999 vedci skúmali rôzne druhy chlorelly a zistili, že produkcia chlorofylu bola najvyššia pri miešaní o 250 rpm [43].

Skupina nemeckých vedcov pozorovala vplyv miešania na *Chlorellu vulgaris* a to tak, že porovnávali koncentráciu suchej biomasy v podmienkach bez miešania a s miešaním o rýchlosti  $126 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ . Po šiestich dňoch kultivácie koncentrácia biomasy v nepremiešavanej a premiešavanej kultúre bola  $1,0$  a  $1,48 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Rýchlosť rastu bola o 21 % väčšia v premiešavanej kultúre. Štúdia dokazuje, že miešanie má pozitívny vplyv na rast riasy. Podrobnejšie je možno vidieť rozdiely na obrázku grafu [44].



Obrázok 6: Porovnanie nárastu koncentrácie biomasy v premiešavanej a nepremiešavanej kultúre [44]

### 2.5.6. CO<sub>2</sub> ako zdroj energie

Vzduch všeobecne obsahuje približne 0,04 % CO<sub>2</sub>. Takéto množstvo nezodpovedá kritériám pre množstvo uhlíka potrebného na fotosyntézu rias. Vzhľadom na to, že oxid uhličitý je hlavným plynom, spôsobujúci skleníkový efekt a jeho koncentrácia sa stále zväčšuje (predpokladané množstvo na rok 2100 je 26 miliárd ton, pričom v roku 1997 bolo nameraných „len“ 7,4 miliardy ton) došlo k mnohým snahám o redukciu tohto plynu v atmosfére. Jednou z možností zníženia obsahu oxidu uhličitého môže byť použitie mikrorias. Tie konvertujú CO<sub>2</sub> na biomasu. Mikroriasy využívajú CO<sub>2</sub> veľmi efektívne, pretože rýchlo rastú a môžu byť pomerne ľahko pestované v rôznych systémoch, ako napríklad vo fotobioreaktoroch [40].

#### 2.5.6.1. Efekt CO<sub>2</sub> na rast pri rôznej hustote buniek

Rýchlosť viazania oxidu uhličitého je priamo závislé na hustote riasy a rýchlosť viazania CO<sub>2</sub> zasa ovplyvňuje rýchlosť rastu buniek riasy. V roku 2007 použil Sheng-Yi a spol. 2 druhy inokula. Inokulum s hustotou  $8 \cdot 10^5$  buniek na 1 ml a inokulum s hustotou  $8 \cdot 10^6$  buniek na 1 ml. Obe kultúry boli prevzdušnené rôznymi koncentraciami CO<sub>2</sub>. Pri oboch typoch sa ukázalo ako najefektívnejšie prevzdušnenie pri obsahu 2% CO<sub>2</sub>. Množstvo biomasy bolo 1,211 g.l<sup>-1</sup> pre kultúru s nižšou hustotou a 1,445 g.l<sup>-1</sup> pre kultúru s vyššou hustotou. Rýchlosť rastu bola 0,492 deň<sup>-1</sup> pre nižšiu a 0,605 deň<sup>-1</sup> pre vyššiu hustotu. Z pokusu vyplýva, že efektívnejšie je použiť kultúru s vyššou koncentráciou buniek. To, že tolerancia rias na CO<sub>2</sub> a odpadové plyny je závislá na hustote buniek potvrdzujú aj iné štúdie (Lee a spol. 2012; Yoshihara a spol., 1996; Yun a spol, 1997) [40].

#### 2.5.6.2. Efekt CO<sub>2</sub> na rast buniek

Jian-Ming a spol. porovnával vplyv koncentrácie CO<sub>2</sub> (0,5 %, 1,0 %, 6,0 % a 12 %) na rast buniek *Chlorelly vulgaris*, pričom pozoroval aj percentuálne množstvo fixovaného CO<sub>2</sub>. Počas prvých 40 hodín bolo množstvo biomasy pri každej skúmanej koncentrácii CO<sub>2</sub> odlišné len zanedbateľne. Neskôr bolo množstvo biomasy konštantné takmer pri všetkých koncentraciách CO<sub>2</sub>, okrem 1%. Kultúra s týmto obsahom CO<sub>2</sub> rástla ďalej a dosiahla najvyššej koncentrácie biomasy spomedzi ostatných, a to približne 0,75 g.l<sup>-1</sup> po 70 hodinách. Najnižšiu hodnotu mali kultúry s 6 % a 12 %, a to približne 0,65 g.l<sup>-1</sup>. Uvedené hodnoty tohto experimentu ťažko porovnávať s hodnotami spomenutými vyššie, pretože obe kultivácie boli vykonávané v rôznych časových dĺžkach. Môžeme však potvrdiť fakt, že riasy sa rozmnožujú a rastú pomalšie ak čerpajú len oxid uhličitý zo vzduchu (0,04 %) [41].

Všeobecne však možno povedať, že toleranciu riasy na koncentráciu CO<sub>2</sub> možno ovplyvniť. Tento jav bol pozorovaný napríklad u *Nannochloropsis oculata*, ktorá nebola schopná rastu pri koncentraciách 5 % CO<sub>2</sub> a vyšších. *Nannochloropsis* bola ešte pred naočkováním pred-adaptovaná na 2 % CO<sub>2</sub>, a neskôr mohli bunky rásť aj pri koncentraciách 15 % CO<sub>2</sub> [41].

Podobne postupoval aj Sheng-Yi a spol.. *Chlorella*, ktorá pri 10 % – 15 % CO<sub>2</sub> vykazovala inhibíciu rastu, bola ešte pred naočkováním adaptovaná na 2 % CO<sub>2</sub> a začala tolerovať tento level CO<sub>2</sub>, to znamená, že nedošlo k žiadnemu poškodeniu riasy ani zastaveniu rastu buniek. Tento pokus dokázal, že pestovať chlorellu v takýchto podmienkach, je možné a vďaka tomuto objavu by bolo možné významne zamedziť zvyšovaniu koncentrácie oxidu uhličitého v atmosfére. Avšak čo sa týka rastu buniek, aj napriek tolerancii vysokého levelu CO<sub>2</sub> je

množstvo biomasy stále menšie ako pri nižších koncentráciách CO<sub>2</sub>. Zatiaľ čo pri 2% bola produkcia biomasy 1,055 gramu na liter za deň, pri 15 % to bolo značne menej, konkrétne 0,74 gramu suchej váhy na liter za deň [40].

V tomto prípade je teda vhodné zamerať sa na jeden cieľ. Buď optimalizovať podmienky tak, aby rozmnožovanie riasy a výsledná produkcia biomasy bola čo najvyššia, to znamená použitie nižšej koncentrácie CO<sub>2</sub>. Alebo naopak, použiť vysoké koncentrácie oxidu uhličitého za cieľom čo najväčšej redukcie tohto plynu, pričom nemožno očakávať vysokú produkciu biomasy chlorelly.

### 2.5.7. Riediacia rýchlosť

Zried'ovacia rýchlosť je typickým regulačným prvkom rýchlosti rastu a rozmnožovania buniek v prietokových fotobioreaktoroch. Vo všeobecnosti platí, že zvyšovanie riediacej rýchlosti v systéme bude smerovať k zvyšovaniu koncentrácie biomasy a bunkovej produkcie [43].

Tang a spol. zistili že produkcia biomasy mikroriasy *Chlorella minutissima* sa pohybovala v rozmedzí od 39 do 137 mg·l<sup>-1</sup>·deň<sup>-1</sup> suchej biomasy, čo bolo zapríčinené zmenami riediacej rýchlosti, konkrétne od 0,08 do 0,64 deň<sup>-1</sup>. Produkcia biomasy *Chlorelly minutissimy* dosiahla najväčšiu hodnotu (137 mg·l<sup>-1</sup>·deň<sup>-1</sup>) pri riediacej rýchlosti 0,33 deň<sup>-1</sup> [47].

Samozrejme, aj v prípade tohto faktoru platí, že každý druh, či kmeň sa líši a vyžaduje iné podmienky. Ako príklad použijem španielsku štúdiu na mikroriase *Chlorella sorokiniana*, počas ktorej vedci regulovali riediacu rýchlosť v rozmedzí od 0,06 až 0,26 h<sup>-1</sup>. Najvyššia produkcia bola dosiahnutá pri riediacej rýchlosti zodpovedajúcej hodnote 0,24 h<sup>-1</sup>, to znamená v prepočte 5,76 deň<sup>-1</sup>, konkrétne bolo dosiahnutých 12,2 gramu suchej váhy na liter za deň. Od samého začiatku mala kultúra tendenciu viac-menej rásť so zvyšujúcou sa riediacou rýchlosťou. Avšak po použití riediacej rýchlosti vyššej ako 0,24 h<sup>-1</sup> nastal prudký pokles v produkcii. Mikroriasa očividne nebola schopná udržať krok so zvyšujúcou sa riediacou rýchlosťou, pretože došlo k presiahnutiu maximálnej špecifickej rastovej rýchlosti riasy *Chlorella sorokiniana*. Tá bola vyhodnotená v roku 1959 ako  $\mu = 0,27 \text{ h}^{-1}$  [48].

### 3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

#### 3.1. Použité chemikálie, prístroje a mikroorganizmy

V nasledujúcich kapitolách sú uvedené tabuľky s chemikáliami, prístrojmi a mikroorganizmami, ktoré boli využité v experimentálnej časti.

##### 3.1.1. Použité chemikálie

KNO <sub>3</sub>	PENTA s.r.o
(Mn <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	PENTA s.r.o
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O p.a	Sigma-Aldrich s.r.o
CaCl <sub>2</sub> p. a	PENTA s.r.o
CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O p.a	PENTA s.r.o
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	PENTA s.r.o
Fe-EDTA	Sigma-Aldrich s.r.o
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O p.a	PENTA s.r.o
Glukóza	PENTA s.r.o
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	PENTA s.r.o
Chloroform	PENTA s.r.o
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> p. a	Sigma-Aldrich s
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O p. a	PENTA s.r.o.
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	PENTA s.r.o
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich s
Močovina p. a	PENTA s.r.o
NaOH	PENTA s.r.o.
Toluén p.a	PENTA s.r.o.
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O p.a	PENTA s.r.o.

Ďalej boli použité chemikálie bežne dostupné v laboratóriu.

##### 3.1.2. Použité prístroje

Analytické váhy	Adam equipment, USA
Autokláv	SANYO Labo Autoclave, USA
Automatické pipety	Witeg, Nemecko
	Proline® Plus, Sartorius, Nemecko
Centrifuga	Jouan C312, USA
Flowbox	Safe FAST Classic 212, Itálie
Skrížený gradient	Brikli, spol s.r.o., ČR
Spektrofotometer	Spekol 11, Carl Zeiss AG, Nemecko
Sušiareň	Chirana HS 62A, ČR
Trepačka	Vercon s.r.o., ČR
Vortex	IKA GENIUS 3, Čína
Zdroj LED osvetlenia	Mean Well, Taiwan



### 3.1.3. Použité mikroorganizmy

V praktickej časti bola použitá mikroriasa *Parachlorella kessleri* získaná z treboňskej zbierky autotrofných organizmov (CCALA). V zbierke je tento kmeň uvádzaný ako 255 *Parachlorella kessleri* alebo pod synonymom *Chlorella kessleri* Fott et Nováková alebo *P.kessleri* Krienitz et al. Tento kmeň bol použitý vo všetkých pokusoch experimentálnej časti.

Tabuľka 2: Charakteristiky vybraného kmeňa riasy

Kmeň riasy	Názov riasy	Taxonómia mikroriasy	Poznámka
CCALA 255	<i>Parachlorella kessleri</i> , Krienitz et al.	<i>Eukaryota</i> Oddelenie <i>Chlorophyta</i> Trieda <i>Trebouxiophyceae</i> Rad <i>Chlorellales</i>	Odporúčané médium : BBM

### 3.2. Kultivačné média

Pre autotrofnú kultiváciu eukaryotickej riasy *Parachlorella kessleri* bolo použité ½ SŠ médium. Rovnaké médium bolo použité aj pri skúmaní optimalizovaných podmienok pre rast mikroriasy. Do média bol pridaný 1 M NaOH v koncentrácii 3 ml/l média. Médium bolo mierne zakalené z dôvodu pridania NaOH pre autoklávovaním. Zloženie média bolo prevzaté z internetovej stránky Botanického ústavu Akadémie vied Českej republiky so zbierkou autotrofných organizmov (CCALA) [53].

Na heterotrofnú kultiváciu bolo použité heterotrofné kultivačné médium, ktorého zloženie možno vidieť v Tabuľka 5.

Pre kultiváciu inokula k heterotrofnej kultivácii bolo použité LB (Lauria-Bertani) médium o koncentrácii 20 g/l (Tabuľka 6).

Tabuľka 3: Zloženie 1/2 SŠ média

Zlúčenina	Množstvo na 1 liter roztoku	Množstvo zásobného roztoku na 1l média
Zásobný roztok č. 1		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	98,8 g	
Stopové prvky kovov (viď Tabuľka 4)	100 ml	10 ml
Zásobný roztok č. 2		
KNO <sub>3</sub>	202,0 g	
CaCl <sub>2</sub>	1,1 g	10 ml
Fe-EDTA	1,8 g	
Zásobný roztok č.3		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34,0 g	10 ml

Tabuľka 4: Zloženie roztoku stopových prvkov kovov v 1/2 SŠ médiu

Zlúčenina	Koncentrácia [g/l]
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,086
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,180
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,404
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,244
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,430
(Mn <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,840

Tabuľka 5: Zloženie média pre heterotrofnú kultiváciu

Zlúčenina	Koncentrácia
	[g/l]
glukóza	20
močovina	1,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3,3
	[mg/l]
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0973
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0222
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,00622
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,00866
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,00755
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,01011
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,00355
CaCl <sub>2</sub>	0,054

Tabuľka 6: Zloženie LB média

Zlúčenina	Koncentrácia [g/l]
Tryptón	10
NaCl	5
Kvasinkový extrakt	5

### 3.3. Použité metódy

Nasledujúce kapitoly boli venované metódam a postupom použitým v experimentálnej časti. Bol opísaný spôsob a podmienky kultivácie, metódy merania rastu mikrorias a extrakcia karotenoidov z vybraných vzoriek.

#### 3.3.1. Fotoautotrofná kultivácia mikrorias

Pri fotoautotrofnej kultivácii bolo použité inokulum mikroriasy *Parachlorella kessleri* (CCALA 255) o absorbancii 5,45, rastúce v ½ SŠ médiu pri teplote 26,5 °C a intenzite svetla  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , prebublávané vzduchom s prídavkom 2 % CO<sub>2</sub>. Na kultiváciu sa použilo 5 ml inokula a 300 ml ½ SŠ média. Zmes bola umiestnená do 300 ml kolónového bioreaktoru. Kultúra bola prebublávaná vzduchom s prídavkom 2 % CO<sub>2</sub> pri teplote 26,5 °C a nepretržitom osvetlení o intenzite  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Rast kultúry bol sledovaný pravidelne meraním biomasy a absorbancie pri vlnovej dĺžke 750 nm. Pre zvýšenie presnosti boli prevedené dve paralelné kultivácie toho istého kmeňa pri rovnakých podmienkach.

#### 3.3.2. Heterotrofná kultivácia

V tejto časti experimentu bola použitý rovnaký kmeň ako v predchádzajúcom prípade, teda CCALA 255. Inokulum bolo získané 17 hodinovou kultiváciou 2 kľúčiek riasy v 5 ml LB média (viď Tabuľka 6). Počas celej doby bolo inokulum premiešavané na trepačke pri 110 rpm, pri 26 °C, vystavené bolo bežnému dennému svetlu. Na vytvorenie kultúry bolo použitých 5 ml inokula a 100 ml média pre heterotrofnú kultiváciu (viď Tabuľka 5). Kultivácia prebiehala v Erlenmeyerových bankách pri teplote 26 °C a počas celého rastu bola premiešavaná na trepačke pri 150 rpm. Rast kultúry bol sledovaný pravidelne meraním biomasy a absorbancie pri 750 nm. Parametre heterotrofnej kultivácie boli taktiež merané paralelne.

#### 3.3.3. Optimalizáciu rastu

Bolo použité inokulum riasy *Parachlorella kessleri* CCALA 255. Inokulum bolo kultivované 23 hodín v 300 ml kolónovom bioreaktore v ½SŠ médiu a prebublávané vzduchom s prídavkom 2 % CO<sub>2</sub> pri nepretržitom osvetlení o intenzite  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a teplote 26,5 °C. Pred začatím kultivácie bola stanovená absorbanca na 0,183. Na 40 Petriho misiek bolo naliatych 5 ml inokula a 25 ml ½ SŠ média (viď Tabuľka 3). Misky s kultúrou boli rozmiestnené na zariadenie krížového gradientu v intervale teplôt 16 – 32 °C a intenzite osvetlenia v rozmedzí od 22 do 492  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Obsah misiek sa pravidelne premiešaval pomocou pipety, aby nedošlo k usadeniu buniek na dno a aby bola kultúra rovnomerne rozptýlená po celom objeme média. Rast buniek bol pozorovaný meraním absorbancie pri 750 nm a to trikrát – na začiatku kultivácie, približne v strede kultivácie, teda po 5 dňoch a na konci kultivácie, v 12. deň.



*Obrázok 7: Zariadenie krížového gradientu*

### **3.3.4. Stanovenie biomasy**

Biomasa bola stanovovaná pri heterotrofnej a fotoautotrofnej kultivácii. Z bioreaktorov bolo do sklenených, predom zvážených, skúmaviek odobratých 5 ml kultúry pomocou pipety. Biomasa bola od média oddelená v centrifuge po dobu 15 minút pri maximálnej rýchlosti 5 000 rpm. Médium bolo odliate a biomasa sa nechala usušiť v sušiarňi pri teplote 105 °C. Po vyschnutí boli skúmavky s biomasou umiestnené do exikátoru a po vychladnutí sa opäť zvážili.

### **3.3.5. Extrakcia karotenoidov**

Po ukončení kultivácie rias, pri ktorej bol sledovaný rast v závislosti na teplote a intenzite svetla, boli vybrané dva vzorky z ktorých boli extrahované karotenoidy. Vzorky sa vyberali na základe najintenzívnejšieho sfarbenia – zelená, pri ktorej sa predpokladal vyšší obsah chlorofylu, a žltá, pri ktorej bola očakávaná vyššia koncentrácia karotenoidov. Riasa bohatšia na karotenoidy bola kultivovaná pri teplote 23,5 °C a intenzite osvetlenia  $492 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Zelená riasa rástla pri rovnakej teplote, ale nižšej intenzite svetla –  $140 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Na extrakciu sa odobrálo 5 ml kultúry do sklenených skúmaviek. Pomocou centrifugácie bola oddelená biomasa od média. Centrifugácia prebiehala 15 minút pri 5 000 rpm. Sedimentovaná biomasa bola prevedená do 2 ml Eppendorfovej skúmavky a obsah bol riadne homogenizovaný pomocou automatickej pipety a destilovanej vody. Skúmavky sa obalili parafilmom, aby nedošlo k vytečeniu alebo úniku látok a biomasa bola okamžite zmrazená, kvôli zabráneniu prípadnému rozkladu aktívnych látok.

Po asi 18 hodinách boli vzorky pomaly rozmrazené pri laboratórnej teplote a ich obsah bol prevedený do sklenených skúmaviek. Voda bola od biomasy oddelená centrifugáciou po dobu 5 minút pri maximálnej rýchlosti (5 000 rpm). Následne bola zliata a k biomase bolo pridaných 600 µl fosfátového pufru a 2 g balotiny. Obsah bol vortexovaný 30 minút na stupni 4 v chladničke, aby sa predišlo vysokému zahriatiu suspenzie. Po rozdrvení bunkovej štruktúry na vortexe nasledovala extrakcia v chloroforme. K suspenzii boli pridané 3 ml chloroformu, zmes bola riadne pretrepaná a umiestnená na vortex, kde bola premiešavaná ďalších 10 minút. Skúmavka bola následne opäť centrifugovaná 7 minút pri maximálnych otáčkach. Po ukončení centrifugácie bola pomocou pipety oddelená fáza obsahujúca pigmenty a postup bol znova opakovaný. Na reextrakciu boli znova použité 3 ml chloroformu, zmes bola 10 minút vortexovaná a 7 minút centrifugovaná. Časť suspenzie obsahujúca pigmenty bola oddelená pipetou a pridaná k predošlému extraktu. Extrakt bol v sklenenej skúmavke doplnený na 5 ml.

Pred analýzou karotenoidov bol odstránený chlorofyl použitím chromatografie na tenkej vrstve (TLC). Jeden mililiter extrahovaných pigmentov bol pomocou pipety nanášaný na chromatografický papier za neustáleho okamžitého sušenia pomocou prúdu vzduchu tak, aby priemer škvrny bol čo najmenší. Papier bol umiestnený do vyvíjacej kadičky obsahujúcej mobilnú fázou – toluén. Kadička bola umiestnená do tmy a prikrytá sklom. Chromatografia prebiehala asi 1 hodinu, kým sa karotenoidy neoddelili od chlorofylu. Po osušení papiera bola vystrihnutá časť obsahujúca karotenoidy. Papier bol extrahovaný v 2 ml chloroformu v tme, až pokiaľ nezmizlo zafarbenie z papiera, čo trvalo približne 45 minút.

Karotenoidy boli stanovené spektrofotometricky pomocou spektrofotometru Spekol 11. Pre meranie absorbcie bola použitá vlnová dĺžka 464 nm, čo je maximálna vlnová dĺžka pre β-karotén, u ktorého sa predpokladá bohaté zastúpenie v zelených mikroriasach.

Pre výpočet koncentrácie karotenoidov vo vybraných vzorkách bola použitá lineárna rovnica z grafu závislosti absorpcie pri 464 nm na koncentrácii karotenoidov o tvare:

$$c = \frac{A_{464} - 0,0222}{0,0325}, \quad (1)$$

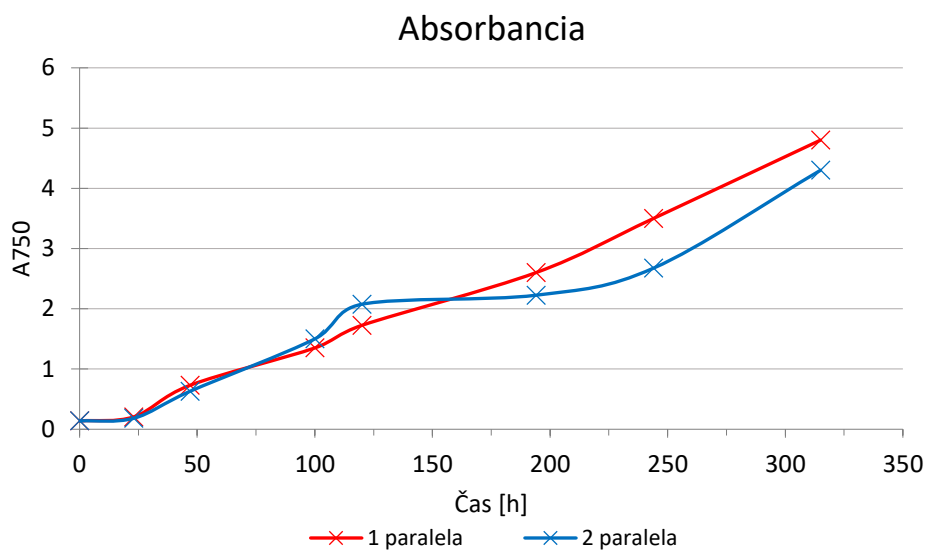
kde c predstavuje koncentráciu karotenoidov v mg/l extraktu a  $A_{464}$  absorbanciu pri 464 nm.

Postup extrakcie spolu s rovnicou na výpočet koncentrácie karotenoidov bol čerpaný z článku Příbyla a spol. z roku 2015 [15].

## 4. VÝSLEDKY A DISKUSIA

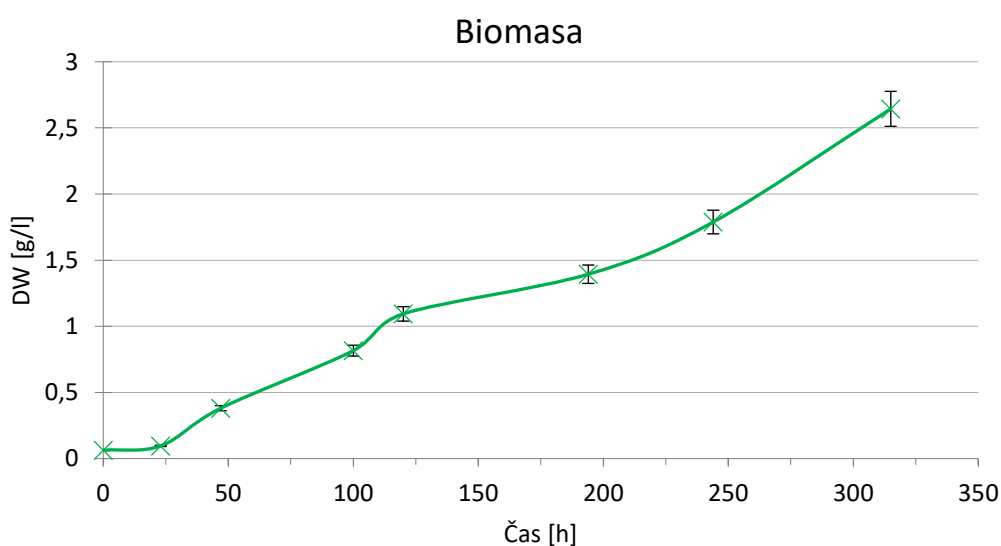
### 4.1. Fotoautotrofná kultivácia

Pre fotoautotrofnú kultiváciu bol zvolený kmeň CCALA 255 *Parachlorella kessleri*. Jej rast bol pozorovaný meraním absorbancie pri 750 nm a stanovením koncentrácie biomasy v pravidelných časových intervaloch. Priebeh kultivácie a celkového rastu mikroriasy možno pozorovať vzhľadom na nárast absorbancie a koncentrácie sušiny v grafoch nižšie. Kultivácia bola ukončená na 12. deň a trvala celkovo 315 hodín. Pre podmienky kultivácie viď kapitolu 3.3.1 vyššie.



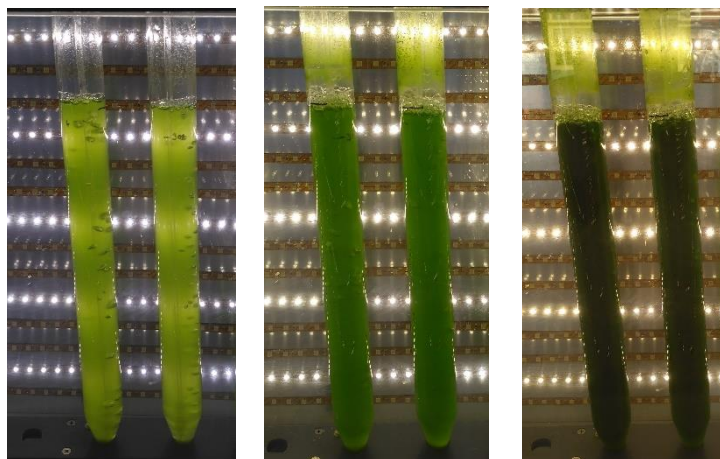
Obrázok 8: Graf závislosti absorbancie na čase

Pre lepšiu charakterizáciu a ukážku rastu sú pri spektrofotometrickom stanovení uvedené obe paralely.



Obrázok 9: Graf závislosti koncentrácie biomasy na čase

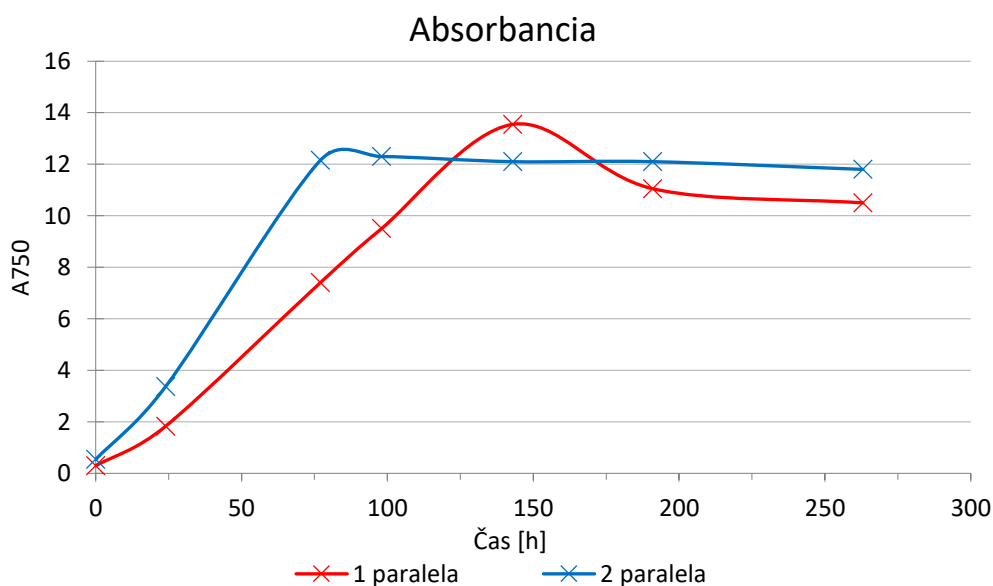
Graf závislosti koncentrácie biomasy na čase vznikol z priemeru koncentrácií biomás vzorky 1 a 2, získaných počas doby kultivácie riasy. V grafe možno pozorovať lag fázu, ktorá trvala zhruba 1 deň. Až do konca experimentu sa mikroriasa nachádzala v štádiu exponenciálneho rastu, teda v log fáze. To, že organizmus stále rástol bolo možno pozorovať aj na neustálej zmene zafarbenia kultúry (viď *Obrázok 10*). V rámci pokusu dosiahla riasa maximálnu koncentráciu biomasy 2,64 g/l.



*Obrázok 10: Zobrazenie kultivácie riasy Parachlorella kessleri. Zľava kultúra počas druhého, piateho a deviateho dňa kultivácie*

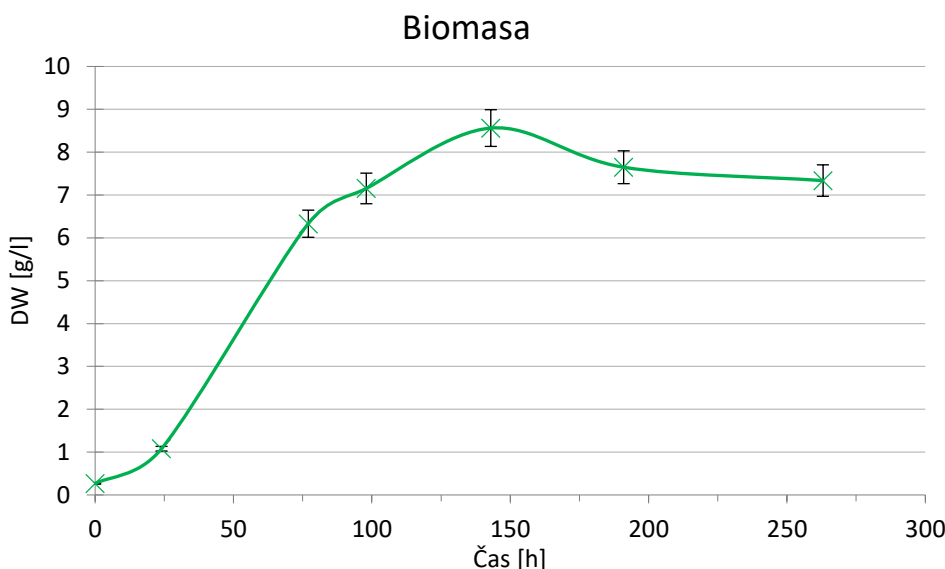
#### 4.2. Heterotrofná kultivácia

Pri heterotrofnej kultivácii CCALA 255 (*Parachlorella kessleri*) bol rast buniek charakterizovaný absorbanciou a koncentráciou sušiny, tak ako v predchádzajúcom prípade. Oba parametre boli zaznamenané graficky. Kultivácia trvala 263 hodín, čo predstavuje 11 dní. Podmienky kultivácie sú uvedené v kapitole 3.3.2 vyššie.



*Obrázok 11: Graf závislosti absorbancie na čase*

Ako vidno v grafe, lag fáza na začiatku kultivácie je takmer nepozorovateľná, to znamená, že adaptácia riasy v heterotrofných podmienkach bola veľmi rýchla a takmer okamžite prešla do fázy exponenciálnej. Pre lepšiu viditeľnosť priebehu rastu buniek riasy bol zostrojený graf závislosti koncentrácie biomasy na čase.



Obrázok 12: Graf závislosti koncentrácie biomasy na čase

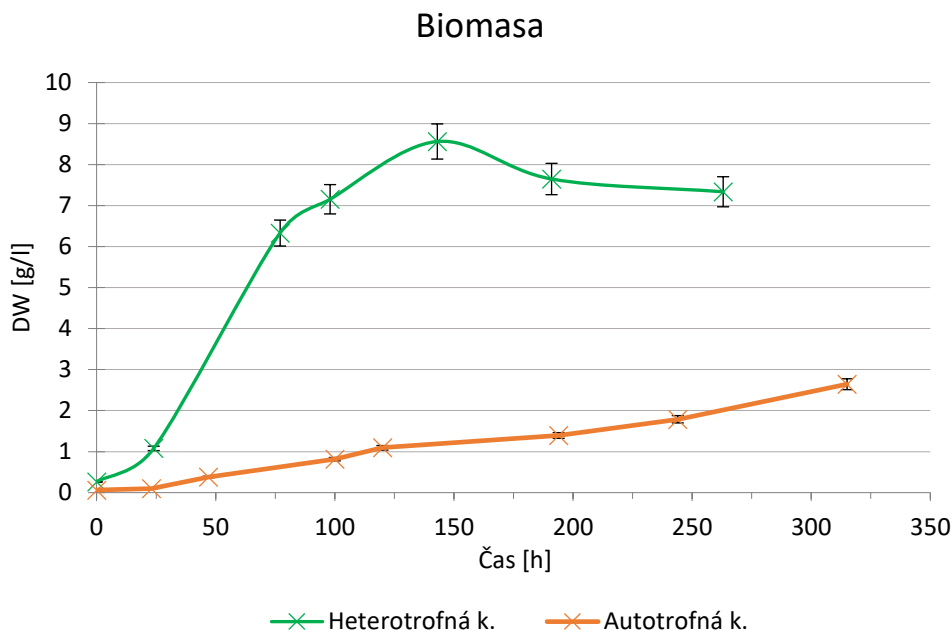
Graf bol zostrojený, ako v predchádzajúcom prípade, z priemeru koncentrácie biomasy dvoch paralelných meraní. Ako už bolo spomenuté, riasa vstúpila do log fázy takmer na samom počiatku kultivácie. Maximálnu koncentráciu dosiahla na šiesty deň od začiatku kultivácie, konkrétne 8,56 g/l. Po dosiahnutí vrcholu začala koncentrácia pomaly klesať a z grafu možno odčítať absenciu stacionárnej fázy. Na konci experimentu bola koncentrácia biomasy 7,34 g/l.

Tím čínskych vedcov, ktorý v roku 2012 pozoroval rast riasy *Chlorella kessleri* v heterotrofnom médiu s koncentráciou glukózy 18 g/l, uvádza podobné výsledky. Kultúra dosiahla na 4. deň koncentráciu 10 g/l suchej biomasy, teda asi 40násobok pôvodnej koncentrácie, a vstúpila do stacionárnej fázy. Po dodaní glukózy sa jej rast opäť obnovil [55].

#### 4.3. Porovnanie fotoautotrofnej a heterotrofnej kultivácie

Keďže cieľom práce bolo porovnať rôzne podmienky kultivácie riasy, boli výsledky fotoautotrofnej a heterotrofnej kultivácie zhrnuté do jedného grafu pre lepšiu prehľadnosť.



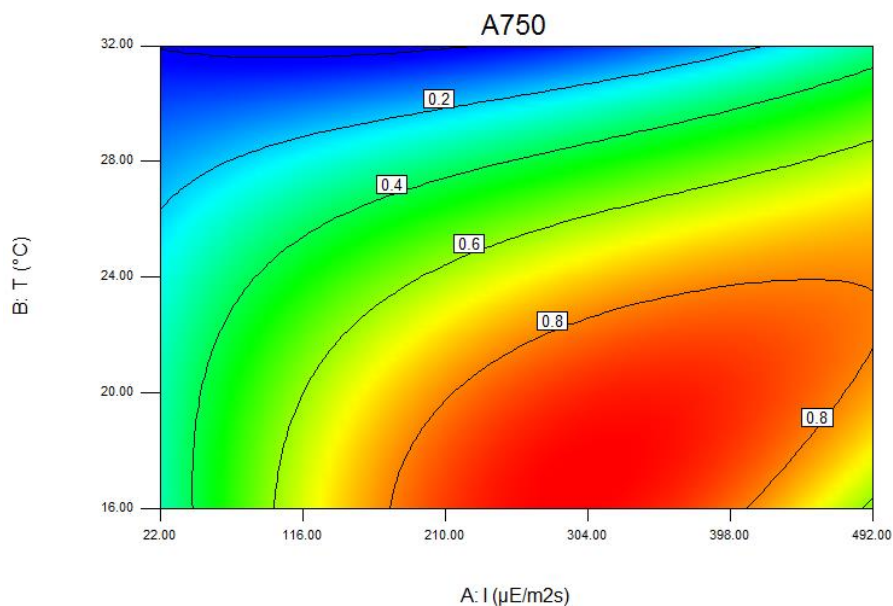


Obrázok 13: Porovnanie rastu pri rôznych metódach kultivácie vzhľadom na biomasu

V porovnaní s autotrofným rastom mala heterotrofná kultúra prudšiu exponenciálnu fázu. Zatiaľ čo heterotrofná kultúra dosiahla svoje maximum (8,56 g/l) v šiesty deň, autotrofná kultúra vtedy ešte stále rástla a dosahovala koncentrácie len niečo málo nad 1 g/l suchej biomasy. To znamená, že zatiaľ čo heterotrofná kultúra zvýšila svoju koncentráciu 32 násobne vzhľadom na počiatok, pri autotrofnej kultivácii bol sledovaný nárast v tom istom čase približne 20 násobný.

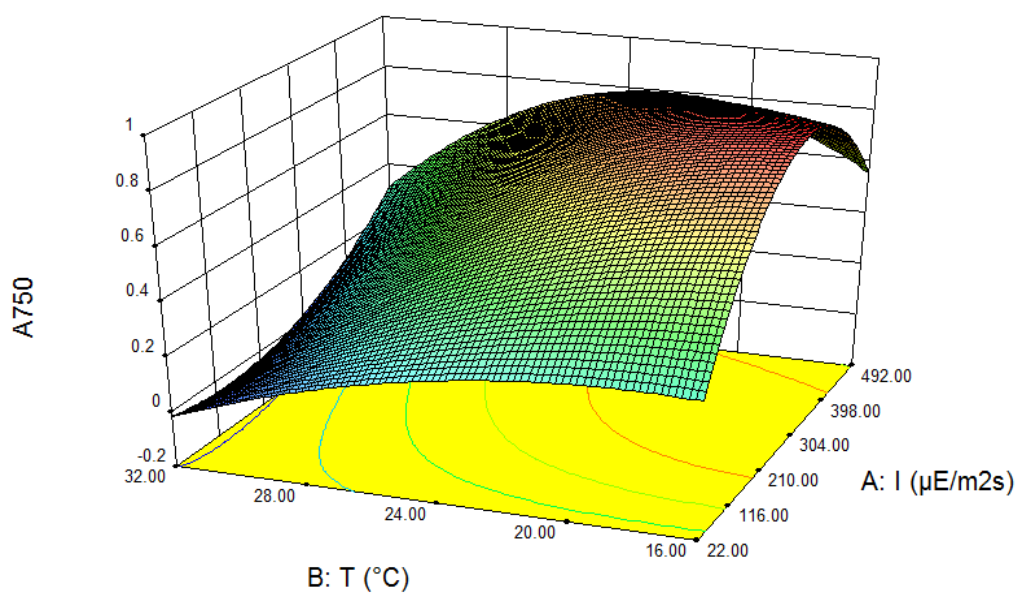
#### 4.4. Optimalizácia rastu

V tejto časti práce bol pozorovaný rast vybraného kmeňa chlorelly (CCALA 255) vzhľadom na rôzne teploty a intenzitu svetla v intervale od 16 – 32 °C a 22 – 492  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  na zariadení krížového gradientu. Po 283 hodinách (12 dní) bol pokus ukončený a bola zmeraná absorbancia každého vzorku. Výsledky boli vyhodnotené graficky (Obrázok 14, Obrázok 15).



Obrázok 14: Závislosť absorbancie na teplote a intenzite svetla

Modrá farba v grafe znázorňuje oblasť, v ktorej bola nameraná absorbancia, teda aj koncentrácia buniek, najnižšia. Oblasť maximálnej dosiahnutej absorbancie je zvýraznená červenou farbou.



Obrázok 15: Zobrazenie závislosti absorbancie na teplote a intenzite svetla v priestorovom grafe

Riasa v optimalizovaných podmienkach dosahovala maximálne koncentrácie pri teplote 18,5 °C a intenzite svetla  $356 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , konkrétne 0,52 g/l. Za ňou nasledovala riasa o koncentrácii 0,48 g/l, ktorá rástla pri rovnakej intenzite svetla a teplote 16 °C.

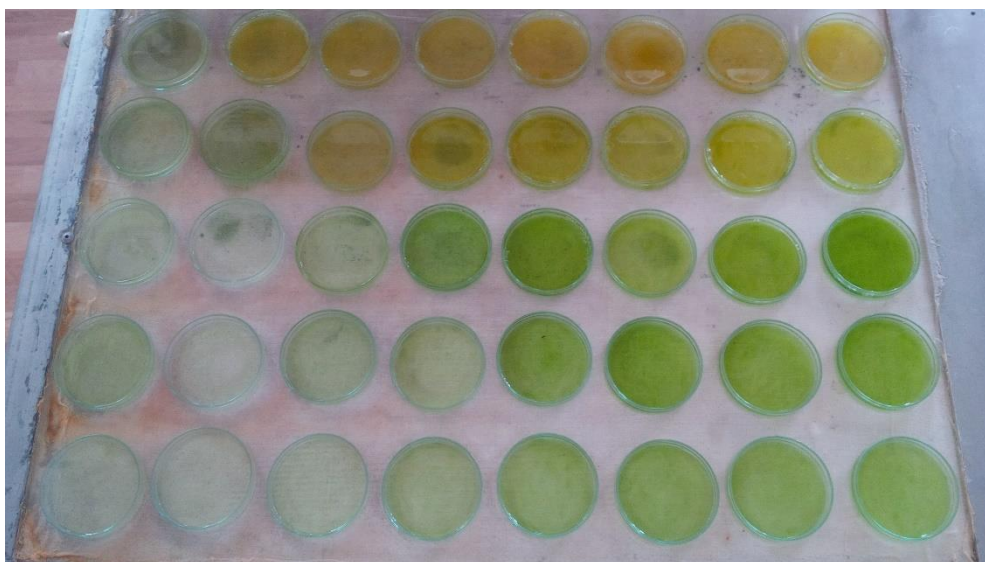
Naopak najhoršie rástli vzorky vystavené teplotám 30 °C a 32 °C. V prípade buniek vystavených teplote 30 °C a intenzite svetla  $140 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  došlo k poklesu koncentrácie

vzhľadom na samotný začiatok kultivácie. To znamená, že riasa v týchto podmienkach začala po dvanástich dňoch hynúť.

Z priemerov absorbancií vyplýva, že riase sa najviac darilo pri teplote 16 a 23,5 °C. Ak by bol pokus zameraný na intenzitu svetla, najlepšie by obstála tá o hodnote 492  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , najhoršie intenzita 22  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Riasy sú háklivé na extrémne teploty, preto je výsledok, vzhľadom na jeho nízku hodnotu (18,5 °C), zarážajúci. Tento jav by sa dal vysvetliť ovplyvnením teploty kultúry žiarením z osvetlenia, ktorému bola kultúra nepretržite vystavená. K tejto domnienke sa prikláňa aj fakt, že objem kultúry bol veľmi malý, teda jeho teplota sa dala ľahko ovplyvniť. Naopak, nízke koncentrácie a pomalý rast biomasy u vyšších teplôt (30 – 30 °C) bol očakávaný. Viaceré výskumy ukazujú, že mikroriasy pri vystavení teplotám vyšším ako 30°C začnú hynúť[32].

Zistená najoptimálnejšia intenzita svetla je oproti iným výskumom zameraným na pozorovanie rastu mikrorias pri rôznych intenzitách svetla relatívne vysoká. To mohlo byť zapríčinené tým, že riasa pri vysokej intenzite svetla produkovala vyššie množstvo karotenoidov, ktoré zaviedli pri meraní absorbancie chybu. Produkciu rôznych koncentrácií chlorofylu a karotenoidov v čase bolo možné pozorovať aj voľným okom (*Obrázok 16*).



*Obrázok 16: Pohľad na riasu vystavenú rôznym podmienkam po dobu 12 dní*

Pre kompletný prehľad priebehu kultivácie v optimalizovaných podmienkach slúži *Tabuľka 7*. V nej možno vidieť zmeny absorbancie vzhľadom na začiatok kultivácie pri všetkých dostupných kombináciách teplôt a intenzít svetla.

Tabuľka 7: Zmena absorbancie v čase pri vystavení rôznej teplote a intenzite svetla

Vzorka č.	Teplota [°C]	Intenzita svetla [ $\mu\text{mol.s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ]	A750		
			t = 0 h	t = 114	t = 283 h
1	32	492	0,020	0,026	0,215
2	32	356	0,020	0,056	0,071
3	32	140	0,020	0,046	0,024
4	32	43	0,020	0,049	0,061
5	32	22	0,020	0,041	0,065
6	30	492	0,020	0,028	0,621
7	30	356	0,020	0,056	0,253
8	30	140	0,020	0,054	0,018
9	30	43	0,020	0,047	0,047
10	30	22	0,020	0,031	0,040
11	28,5	492	0,020	0,038	0,725
12	28,5	356	0,020	0,090	0,519
13	28,5	140	0,020	0,052	0,154
14	28,5	43	0,020	0,041	0,147
15	28,5	22	0,020	0,033	0,073
16	26	492	0,020	0,029	0,734
17	26	356	0,020	0,075	0,792
18	26	140	0,020	0,071	0,549
19	26	43	0,020	0,074	0,155
20	26	22	0,020	0,064	0,143
21	23,5	492	0,020	0,063	0,749
22	23,5	356	0,020	0,070	0,802
23	23,5	140	0,020	0,085	0,799
24	23,5	43	0,020	0,117	0,362
25	23,5	22	0,020	0,097	0,270
26	21	492	0,020	0,066	0,756
27	21	356	0,020	0,040	0,630
28	21	140	0,020	0,052	0,491
29	21	43	0,020	0,099	0,460
30	21	22	0,020	0,043	0,330
31	18,5	492	0,020	0,073	0,660
32	18,5	356	0,020	0,068	0,914
33	18,5	140	0,020	0,149	0,694
34	18,5	43	0,020	0,163	0,387
35	18,5	22	0,020	0,011	0,255
36	16	492	0,020	0,086	0,697
37	16	356	0,020	0,150	0,851
38	16	140	0,020	0,218	0,788
39	16	43	0,020	0,162	0,429
40	16	22	0,020	0,069	0,248

#### 4.5. Extrakcia karotenoidov

Extrakcia karotenoidov bola prevedená pre potvrdenie domnienky o zvýšenej produkcii karotenoidov vo vzorkách vystavených vyššej intenzite svetla. Karotenoidy boli stanovené u vzorky č. 21 a 23 (viď *Tabuľka 7*). Pre priebeh extrakcie a rovnicu pre výpočet viď kapitolu 3.3.5 vyššie.

*Tabuľka 8: Namerané hodnoty absorbancie a vypočítané koncentrácie karotenoidov vo vzorke 21 a 23*

Vzorka č.	21	23
$A_{464}$	0,265	0,135
$c_{\text{karot}}$ [mg/l]	3,735	1,735

Bolo dokázané, že riasa vskutku produkovala viac karotenoidov pri vyššej intenzite svetla. Zatiaľ čo pri osvetlení o  $140 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  bola ich koncentrácia 1,735 mg/l, pri vyššej intenzite svetla to bolo viac ako dvojnásobok – 3,735 mg/l. Niektoré druhy mikrorias totiž produkujú v stresových podmienkach, ku ktorým patrí napríklad aj vysoká intenzita svetla, vyššie množstvo vedľajších produktov, ktoré ich chránia. Medzi tieto metabolity sa zaraďujú aj karotenoidy. V prípade štúdia z roku 1995 produkovala *Chlorella vulgaris* v stresových podmienkach predovšetkým luteín, astaxantín a kataxantín [54].

## 5. ZÁVER

Cieľom bakalárskej práce bolo získanie teoretických poznatkov o kultivácii rias rodu *Chlorella* a následne ich aplikácia za cieľom optimalizovania podmienok kultivácie. Experimentálne bol sledovaný priebeh a rýchlosť rastu mikroriasy CCALA 255 *Parachlorella kessleri* v rôznych podmienkach. Výsledky rôznych typov kultivácii boli porovnané.

V prvej časti pokusu bola porovnávaná fotoautotrofná a heterotrofná kultivácia. Autotrofná kultivácia prebiehala vo fotobioreaktore za nepretržitého osvetlenia. Heterotrofná kultivácia prebiehala 11 dní v menšom objeme v Erlenmeyerových bankách. Experimentom bolo potvrdené, že rýchlosť rastu riasy bola vyššia pri heterotrofnej kultivácii. Maximálna koncentrácia bola dosiahnutá za 6 dní, kedy sa množstvo buniek vzhľadom na počiatok zvýšilo 32 násobne a koncentrácia biomasy dosiahla hodnotu  $8,56 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Oproti autotrofnej kultúre v tom istom čase to bolo približne 1,7 krát viac.

Kultivácia riasy, v exponenciálnej fáze rastu, môže prejsť plynulo do kontinuálneho systému, ktorý sa hojne využíva pri veľkoobjemových kultiváciách, napríklad pre komerčné účely. Preto je žiadúce aby sa kultúra dostala do fázy exponenciálneho rastu v čo najrýchlejšej dobe. Z experimentu vyplýva, že použitie heterotrofnej kultivácie by bolo pre tento účel vhodnejšie. Nevýhodou tohto prístupu by bolo opustenie pôvodnej myšlienky kultivácie rias za účelom redukcie  $\text{CO}_2$  z atmosféry. Treba tiež podotknúť, že heterotrofná kultivácia je náročná, vzhľadom na jednoduchú kontamináciu, ktorej riziko sa s použitím kontinuálnych bioreaktorov zvyšuje.

Ďalším experimentom bolo optimalizovanie podmienok, konkrétne teploty a intenzity svetla, pre rast toho istého kmeňa mikroriasy ako v predchádzajúcom pokuse. Riasa bola po dobu 12 dní vystavená rôznym kombináciám teploty ( $16 - 32 \text{ }^\circ\text{C}$ ) a intenzity svetla ( $22 - 492 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Na konci bola zmeraná absorbanca každej vzorky. Pokus bol vyhodnotený na základe hodnôt absorbancie, ktorá je priamo úmerná koncentrácii biomasy. Najvyšší rast bol zaznamenaný u riasy kultivovanej pri  $18,5 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $356 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Z experimentu vyplýva, že riasam sa obecné darilo pri nižšej teplote ( $23,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) a vysokej intenzite svetla ( $492 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Predpokladalo sa, že tak vysoká intenzita svetla bude mať na riasu inhibujúce účinky. Jej rast možno vysvetliť tvorbou karotenoidov ako metabolitov, ktoré sa akumulujú v zelených riasach hlavne pri vystavení stresovým podmienkam. Tie mohli do určitej miery ovplyvniť hodnoty absorbancie.

Pre overenie predpokladu bola vykonaná extrakcia karotenoidov v dvoch vzorkách. Ukázalo sa, že riasy vystavené väčšiemu svetlu vskutku produkovali vyššie koncentrácie karotenoidov. Pre porovnanie, riasa kultivovaná pri  $492 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  vyprodukovala viac ako dvojnásobnú koncentráciu karotenoidov oproti vzorke rastúcej pri  $140 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Experimentom bolo dokázané, že rast riasy závisí od viacerých faktorov, z ktorých niektoré boli v práci otestované. Vykonané pokusy by mohli byť námetom pre ďalšiu prácu.

## 6. ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] GOUVEIA, Luisa. *Microalgae as a feedstock for biofuels*. Heidelberg: Springer, 2011. ISBN 9783642179976.
- [2] RICHMOND, Amos (ed.). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science, 2004. ISBN 978-0-632-05953-9.
- [3] Species of Chlorella. *Yaeyama Chlorella* [online]. [cit. 2016-08-16]. Dostupné z: <http://www.yaeyamachlorella.com/En/home/chlorella/basics/basics2.htm>
- [4] Pěstování chlorelly v ČR. *Česká řasa z Třeboně* [online]. 2015 [cit. 2016-08-16]. Dostupné z: <http://www.ceskarasa.cz/pestovani-chlorelly-v-cr/>
- [5] ANDERSEN, Robert A. *Algal culturing techniques*. Burlington, Mass.: Elsevier/Academic Press, c2005. ISBN 9780120884261.
- [6] CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* [online]. 2007, **25**(3), 294-306 [cit. 2016-08-16]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001. ISSN 07349750. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975007000262>
- [7] PEREZ-GARCIA, Octavio, Froylan M.E. ESCALANTE, Luz E. DE-BASHAN a Yoav BASHAN. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research* [online]. 2011, **45**(1), 11-36 [cit. 2017-04-15]. DOI: 10.1016/j.watres.2010.08.037. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135410006019>
- [8] BLAIR, Matthew Forrest, Bahareh KOKABIAN a Veera Gnanaswar GUDE. Light and growth medium effect on Chlorella vulgaris biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 2014, 2(1), 665-674 [cit. 2016-09-29]. DOI: 10.1016/j.jece.2013.11.005. ISSN 22133437.
- [9] Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture.. *FAO* [online]. [cit. 2016-08-16]. Dostupné z: <http://www.fao.org/docrep/003/w3732e/w3732e06.htm#b5-2.3.5.%20Algal%20culture%20techniques>
- [10] BARSANTI, Laura a Paolo GUALTIERI. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2006. ISBN 0-8493-1467-4.
- [11] FOGG, G. E. a Brenda. THAKE. *Algal cultures and phytoplankton ecology*. 3rd ed. Madison, Wis.: University of Wisconsin Press, 1987. ISBN 0299105601.
- [12] Němec M., Horáková D.: *Základy mikrobiologie*, Brno: MU Brno, 1999. 3. vyd. 233 s.
- [13] SINGH, R.N. a Shaishav SHARMA. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1016/j.rser.2012.01.026. ISBN 10.1016/j.rser.2012.01.026. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032112000275>
- [14] SAFI, Carl, Bachar ZEBIB, Othmane MERAH, Pierre-Yves PONTALIER a Carlos VACA-GARCIA. Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2014, **35**, 265-278 [cit. 2016-10-07]. DOI: 10.1016/j.rser.2014.04.007. ISSN 13640321. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032114002342>

- [15] PŘIBYL, Pavel, Vladislav CEPÁK, Petr KAŠTÁNEK a Vilém ZACHLER. Elevated production of carotenoids by a new isolate of *Scenedesmus* sp. *Algal Research* [online]. 2015, **2015**(11), 22-27 [cit. 2017-04-14]. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.020>. ISSN 2211-9264. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221192641500140X>
- [16] BAJPAI, Divya a V.K. TYAGI. Biodiesel: Source, Production, Composition, Properties and Its Benefits. *Journal of Oleo Science* [online]. 2006, **55**(10), 487-502 [cit. 2016-10-07]. DOI: 10.5650/jos.55.487. ISSN 1345-8957. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jos/55.487?from=CrossRef>
- [17] SCHENK, Peer M., Skye R. THOMAS-HALL, Evan STEPHENS, Ute C. MARX, Jan H. MUSSGUNG, Clemens POSTEN, Olaf KRUSE a Ben HANKAMER. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research* [online]. 2008, **1**(1), 20-43 [cit. 2016-10-07]. DOI: 10.1007/s12155-008-9008-8. ISSN 1939-1234. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12155-008-9008-8>
- [18] SRIVASTAVA, Anjana a Ram PRASAD. Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2000, **4**(2), 111-133 [cit. 2016-10-07]. DOI: 10.1016/S1364-0321(99)00013-1. ISSN 13640321. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032199000131>
- [19] HODAIFA, Gassan, M<sup>a</sup> Eugenia MARTÍNEZ, Rafael ÓRPEZ a Sebastián SÁNCHEZ. Inhibitory effects of industrial olive-oil mill wastewater on biomass production of *Scenedesmus obliquus*. *Ecological Engineering* [online]. 2012, **42**, 30-34 [cit. 2016-10-07]. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2012.01.020. ISSN 09258574. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925857412000420>
- [20] HEIDARI, S.A., O. FARHADIAN and N.M. SOOFIANI, "Biomass production and ammonia and nitrite removal from fish farm effluent by *scenedesmus quadricauda* culture," *Journal of Environmental Studies*. 2011, **37**(59), 15-28 (2011).
- [21] MUÑOZ, Raul a Benoit GUIEYSSE. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research* [online]. 2006, **40**(15), 2799-2815 [cit. 2016-10-07]. DOI: 10.1016/j.watres.2006.06.011. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135406003605>
- [22] MUÑOZ, Raul, Marco JACINTO, Benoit GUIEYSSE a Bo MATTIASSON. Combined carbon and nitrogen removal from acetonitrile using algal–bacterial bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2005, **67**(5), 699-707 [cit. 2016-10-07]. DOI: 10.1007/s00253-004-1811-3. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-004-1811-3>
- [23] MUNIR, N., A. IMITIAZ, N. SHARIF a S. NAZ. Optimization of growth conditions of different algal strains and determination of their lipid content. *The Journal of Animal & Plant Science*. 2015(25), 546-553. ISSN 1018-7081.
- [24] FENG, Yujie, Chao LI a Dawei ZHANG. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresource Technology* [online]. 2011, **102**(1), 101-105 [cit. 2016-10-07]. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.016. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085241000996X>

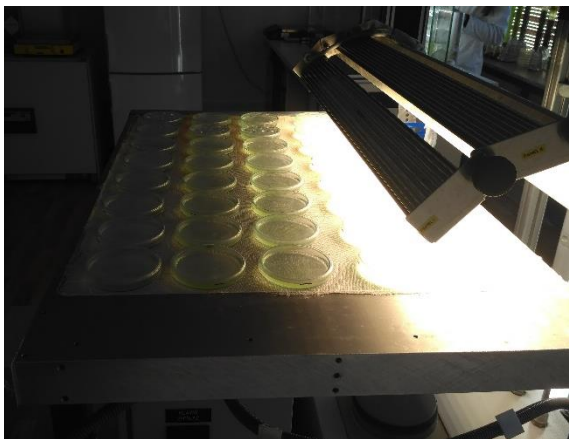


- [25] SIRISANSANEEYAKUL, Sarote, Somruethai SINGHASUWAN, Wanna CHOORIT, Natapas PHOOPAT, Jose Luis GARCIA a Yusuf CHISTI. Photoautotrophic Production of Lipids by Some Chlorella Strains. *Marine Biotechnology* [online]. 2011, **13**(5), 928-941 [cit. 2016-10-07]. DOI: 10.1007/s10126-010-9355-2. ISSN 1436-2228. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10126-010-9355-2>
- [26] RICHMOND, A., S. KARG and S. BOUSSIBA, "Effects of bicarbonate and carbon dioxide on the competition between chlorella vulgaris and spirulina platensis" *Plant and Cell Physiology*. 23, 1411-1417 (1982).
- [27] ZHENG, H., Z. GAO, Q. ZHANG, H. HUANG, X. Ji, H. SUN and C. DOU, "Effect of inorganic carbon source on lipid production with autotrophic Chlorella vulgaris" *Shengwu Gongcheng Xuebao/Chinese Journal of Biotechnology*. 27, 436-444 (2011).
- [28] YEH, Kuei-Ling, Jo-Shu CHANG a Wen-ming CHEN. Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga Chlorella vulgaris ESP-31. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2010,**10**(3), 201-208 [cit. 2016-10-07]. DOI: 10.1002/elsc.200900116. ISSN 16180240. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.200900116>
- [29] DEVGOSWAMI, C.R., M.C. KALITA, J. TALUKDAR, R. BORA and P. SHARMA, "Studies on the growth behavior of chlorella, haematococcus and scenedesmus sp. in culture media with different concentrations of sodium bicarbonate and carbon dioxide gas,". *African Journal of Biotechnology* [online]. 2011, **10**(61), 13128-13138 [cit. 2016-10-07]. DOI: 10.5897/AJB11.888
- [30] AMINI KHOEYI, Zahra, Jafar SEYFABADI a Zohreh RAMEZANPOUR. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, Chlorella vulgaris. *Aquaculture International* [online]. 2012, **20**(1), 41-49 [cit. 2016-10-07]. DOI: 10.1007/s10499-011-9440-1. ISSN 0967-6120. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10499-011-9440-1>
- [31] JACOB-LOPES, Eduardo, Carlos Henrique Gimenes SCOPARO, Lucy Mara Cacia Ferreira LACERDA a Telma Teixeira FRANCO. Effect of light cycles (night/day) on CO2 fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* [online]. 2009,**48**(1), 306-310 [cit. 2016-10-07]. DOI: 10.1016/j.cep.2008.04.007. ISSN 02552701. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0255270108001037>
- [32] TERRY, Kenneth L. Photosynthesis in modulated light: Quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 1986, **28**(7), 988-995 [cit. 2016-08-25]. DOI: 10.1002/bit.260280709. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260280709>
- [33] RAVELONANDRO, Perre H., Dominique H. RATIANARIVO, Claire JOANNIS-CASSAN, Arsene ISAMBERT a Marson RAHERIMANDIMBY. Influence of light quality and intensity in the cultivation of Spirulina platensis from Toliara (Madagascar) in a closed system. *JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY* [online]. 2008, **83**(6), 842-848 [cit. 2016-08-25]. DOI: 10.1002/jctb.1878. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1002/jctb.1878/full>

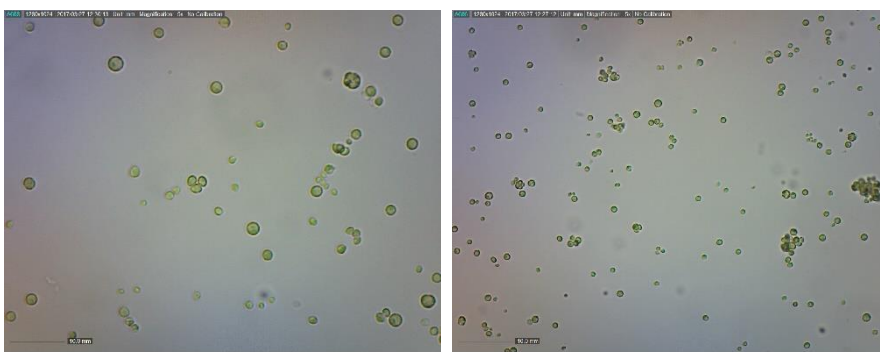
- [34] YEH, Kuei-Ling, Jo-Shu CHANG a Wen-ming CHEN. Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2010, **10**(3), 201-208 [cit. 2016-08-25]. DOI: 10.1002/elsc.200900116. ISSN 16180240. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.200900116>
- [35] LEE, Choul-Gyun a Bernhard O., PALSSON. High-density algal photobioreactors using light-emitting diodes. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 1994, **44**(10), 1161-1167 [cit. 2016-08-26]. DOI: 10.1002/bit.260441002. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260441002>
- [36] BELASCO, Warren. Algae Burgers for a Hungry World? The Rise and Fall of *Chlorella* Cuisine. *Technology and Culture*. 1997, **38**(No. 3), 608-634 [cit. 2016-08-26]. DOI: 10.2307/3106856
- [37] BECKER, Eberhard W. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. New York: Cambridge University Press, 1994. Cambridge studies in biotechnology, 10. ISBN 0-521-06113-X.
- [38] MAYO, Aloice W. Effects of temperature and pH on the kinetic growth of unialga *Chlorella vulgaris* cultures containing bacteria. *Water Environment Research* [online]. 1997, **69**(1), 64-72 [cit. 2016-10-07]. DOI: 10.2175/106143097X125191. ISSN 10614303. Dostupné z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1061-4303&volume=69&issue=1&spage=64>
- [39] CHANG, Hai-Xing, Yun HUANG, Qian FU, Qiang LIAO a Xun ZHU. Kinetic characteristics and modeling of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and CO<sub>2</sub> biofixation considering the coupled effects of light intensity and dissolved inorganic carbon. *Bioresource Technology* [online]. 2016, **206**, 231-238 [cit. 2016-08-29]. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.01.087. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416300633>
- [40] CHIU, Sheng-Yi, Chien-Ya KAO, Chiun-Hsun CHEN, Tang-Ching KUAN, Seow-Chin ONG a Chih-Sheng LIN. Reduction of CO<sub>2</sub> by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology* [online]. 2008, **99**(9), 3389-3396 [cit. 2016-09-24]. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.08.013. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852407006384>
- [41] LV, Jian-Ming, Li-Hua CHENG, Xin-Hua XU, Lin ZHANG a Huan-Lin CHEN. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology* [online]. 2010, **101**(17), 6797-6804 [cit. 2016-09-24]. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.03.120. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852410006346>
- [42] KAŠTÁNEK, František. *Bioinženýrství*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2001. ISBN 8020007687.
- [43] CATELLANOS, Claudia S. *Batch and Continuous Studies of Chlorella Vulgaris in Photo-Bioreactors* [online]. Western Ontario, 2013 [cit. 2016-10-08]. Dostupné z: <http://ir.lib.uwo.ca/cgi/viewcontent.cgi?article=2377&context=etd>. Vedoucí práce Amarjeet Bassi.

- [44] LEUPOLD, Marco, Stefan HINDERSIN, Giseller GUST, Martin KERNER a Dieter HANELT. Influence of mixing and shear stress on *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology* [online]. 2013, **25**(2), 485-495 [cit. 2016-10-09]. DOI: 10.1007/s10811-012-9882-5. ISSN 0921-8971. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-012-9882-5>
- [45] Image gallery of CAUP strains. *Katedra botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze* [online]. Praha [cit. 2016-10-09]. Dostupné z: [http://botany.natur.cuni.cz/algo/CAUP/H1917\\_Chlorella\\_vulgaris.htm](http://botany.natur.cuni.cz/algo/CAUP/H1917_Chlorella_vulgaris.htm)
- [46] Jak a kde se pěstuje řasa chlorella českého původu. *Topvyziva* [online]. 2011 [cit. 2016-10-09]. Dostupné z: <https://www.topvyziva.cz/inpage/rasa-chlorella-ceskeho-puvodu/>
- [47] TANG, Haiying, Meng CHEN, K.Y. SIMON NG a Steven O. SALLEY. Continuous microalgae cultivation in a photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2012, **109**(10), 2468-2474 [cit. 2016-10-28]. DOI: 10.1002/bit.24516. ISSN 00063592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.24516>
- [48] CUARESMA, María, Marcel JANSSEN, Carlos VÍLCHEZ a René H. WIJFFELS. Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2009, **104**(2), 352-359 [cit. 2016-10-28]. DOI: 10.1002/bit.22394. ISSN 00063592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.22394>
- [49] Photobioreactor. *Wikipedia* [online]. San Francisco [cit. 2016-10-30]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Photobioreactor>
- [50] Biomass from Algae. In: *Wacker* [online]. [cit. 2016-10-30]. Dostupné z: [https://www.wacker.com/cms/en/100years/r\\_and\\_d/biomasse.jsp](https://www.wacker.com/cms/en/100years/r_and_d/biomasse.jsp)
- [51] Unusual research paper about design and construction algae pilot plant. Wageningen University & Research [online]. Wageningen [cit. 2016-10-30]. Dostupné z: <https://www.wur.nl/en/newsarticle/Unusual-research-paper-about-design-and-construction-algae-pilot-plant.htm>
- [52] Growth Curve. TutorVista.com [online]. [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <http://www.tutorvista.com/content/biology/biology-iv/plant-growth-movements/growth-curve.php>
- [53] 1/2 SŠ medium. *CCALA* [online]. Třeboň [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <http://ccala.butbn.cas.cz/cs/node/14414>
- [54] GOUVEIA, L., V. VELOSO a A. REIS. Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*. 1996, **57**(2), 157-159, 161-163. DOI: [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00058-2](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00058-2).
- [55] WANG, Yan, Tao CHEN a Song QIN. Heterotrophic cultivation of *Chlorella kessleri* for fatty acids production by carbon and nitrogen supplements. *Biomass and Bioenergy*. 2012, **2012**(47), 402-409. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.018>.

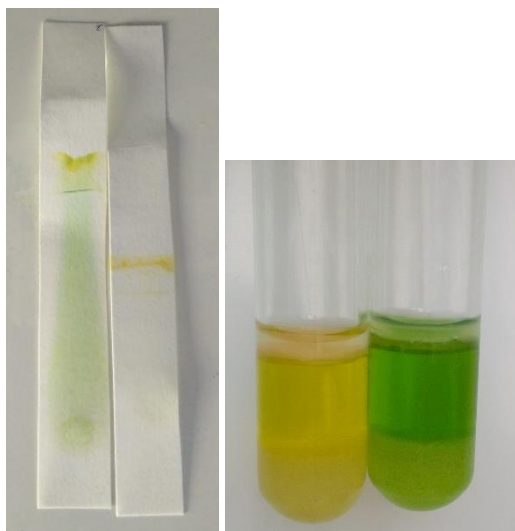
## 7. PRÍLOHY



*Obrázok 17: Pohľad na krížový gradient z boku*



*Obrázok 19: Mikroskopické snímky Parachlorelly kessleri (CCALA 255)*



*Obrázok 18: Priebeh extrakcie - vľavo chromatografický papier po chromatografii na tenkej vrstve, vpravo zafarbenie po extrakcii chloroformom*